蛋白质技术手册

汪家政 范 明 主编

.3-62

图书馆

科学出版社

蛋白质技术手册

汪家政　范　明　主编

学　出　版　社

内 容 简 介

本书是一本蛋白质研究实验方法的工具书。内容包括蛋白质分离纯化、蛋白质浓度测定、蛋白质溶液的浓缩、凝胶电泳、等电聚焦电泳、双向电泳、毛细管电泳、免疫印迹、层析技术、蛋白质晶体培养和蛋白质一级结构测定等。本书介绍了这些方法的基本原理，重点在于每种方法的操作过程和经验总结，指出成败的关键、可能出现的问题及解决的方法。书后附有蛋白质研究的各种常用数据表。本书可供生物化学、分子生物学、生物技术、医药卫生以及农、林、牧等方面有关的科研、教学与技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质技术手册/汪家政，范明主编．-北京：科学出版社，2000.8

ISBN 7-03-008329-6

Ⅰ.蛋… Ⅱ.①汪… ②范… Ⅲ.蛋白质-生物化学-技术 Ⅳ.Q510.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 03908 号

科 学 出 版 社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

科 地 亚 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

2000 年 8 月第 一 版 开本：850×1168 1/32

2000 年 8 月第一次印刷 印张：10 1/4

印数：1—2 300 字数：264 000

定价：28.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈新欣〉）

主编

汪家政　　范　明
（军事医学科学院基础医学研究所 100850）

编著者

柳　川	军事医学科学院基础医学研究所	100850
蒲小平	北京大学医学部药学院药理系	100083
穆援越	军事医学科学院基础医学研究所	100850
刘晓达	军事医学科学院野战输血研究所	100850
马立人	军事医学科学院放射医学研究所	100850
王全立	军事医学科学院野战输血研究所	100850
陈　谦	军事医学科学院基础医学研究所	100850
刘耀波	军事医学科学院基础医学研究所	100850
咸海清	军事医学科学院基础医学研究所	100850
李　镭	北京大学化学与分子工程学院	100871

前　言

生命科学是21世纪的带头学科，在现代生命科学最前沿的研究领域中，以研究人类基因组结构和功能为主的“蛋白质组计划”已经成为分子生物学的重要课题，并带动了整个生命科学的发展，随着科学不断发展，研究手段日新月异，我们从实践中体会到，在蛋白质研究的日常工作中，一本关于蛋白质研究方法的工具书会发挥很大的作用。1990年前后出版的《分子克隆实验指南》使核酸操作技术实现了标准化，推动了“基因组计划”的发展和实现。由于蛋白质结构和性质的复杂与多样性，难以归纳出一般性的分析操作规程。因而缺少有关蛋白质技术方面的工具书。我们参考了“Protein Methods”(1996年第二版)一书的内容和编写方法，结合自己多年研究实践的经验和体会，编写了这本《蛋白质技术手册》。内容包括蛋白质的准备、提取、溶解、浓度测定、浓缩、电泳、层析、免疫印迹、晶体培养和一级结构测定等，共14章。这是一本适用于各种蛋白质分析和操作的实验指南。为实验者提供实用、有效的蛋白质操作信息，使实验能够直接、快捷地进行，是我们编写这本书的心愿。书中插图的制作由北京医科大学人民医院李钧完成。

本书在出版时得到军事医学科学院基础医学研究所和院科技部的出版经费资助。

目　录

第一章　蛋白质分离的准备 …… 1
1.1　引言 …… 1
1.2　缓冲液 …… 1
1.2.1　缓冲液的性质 …… 1
1.2.2　缓冲液配制 …… 4
1.2.3　浓度对缓冲液 pH 值的影响 …… 5
1.2.4　某些缓冲液使用时的注意事项 …… 6
1.2.5　防止缓冲液受污染 …… 7
1.2.6　水的纯度 …… 7
1.3　盐、金属离子和螯合剂 …… 7
1.3.1　离子强度 …… 7
1.3.2　二价阳离子 …… 7
1.3.3　螯合剂 …… 8
1.4　还原剂 …… 8
1.4.1　总则 …… 8
1.4.2　特殊情况 …… 8
1.5　去垢剂 …… 9
1.5.1　去垢剂的分类 …… 9
1.5.2　蛋白质溶解的初始操作步骤 …… 13
1.6　蛋白质的环境因素 …… 14
1.6.1　表面效应 …… 14
1.6.2　温度 …… 14
1.6.3　储存 …… 15
1.7　蛋白酶抑制剂 …… 16
1.7.1　常用抑制剂 …… 16
1.7.2　蛋白酶抑制剂混合使用 …… 18
第二章　蛋白质的提取和溶解 …… 20

2.1 引言…… 20
2.2 细胞破碎和蛋白质溶解…… 21
2.2.1 匀浆…… 21
2.2.2 超声…… 23
2.2.3 高压匀浆…… 25
2.2.4 研磨…… 26
2.2.5 (高速)珠磨…… 27
2.2.6 酶溶…… 27
2.2.7 化学渗透…… 28
2.2.8 其他方法…… 29
2.3 包涵体蛋白质的溶解…… 29
2.3.1 包涵体蛋白质的溶解及复性…… 30
2.3.2 防止包涵体形成…… 33
第三章 蛋白质浓度测定 …… 38
3.1 280 纳米(A_{280})光吸收法 …… 38
3.1.1 提要…… 38
3.1.2 设备…… 39
3.1.3 试剂…… 39
3.1.4 操作步骤…… 39
3.1.5 注意事项…… 39
3.2 Bradford 检测法 …… 42
3.2.1 提要…… 42
3.2.2 设备…… 43
3.2.3 试剂…… 43
3.2.4 操作步骤…… 43
3.2.5 注意事项…… 46
3.3 Lowry 检测法…… 47
3.3.1 提要…… 47
3.3.2 设备…… 48
3.3.3 试剂…… 48

3.3.4 操作步骤…… 49
3.3.5 注意事项…… 50
3.4 二喹啉甲酸(BCA)检测法…… 51
3.4.1 提要…… 51
3.4.2 设备…… 52
3.4.3 试剂…… 52
3.4.4 操作步骤…… 52
3.4.5 注意事项…… 54
3.5 斑点滤膜结合法…… 54
3.5.1 概述…… 54
3.5.2 操作步骤…… 54
3.6 干扰物质表…… 55
第四章 蛋白质溶液的浓缩 …… 60
4.1 分析方法…… 60
4.1.1 三氯醋酸沉淀法…… 60
4.1.2 丙酮沉淀法…… 61
4.1.3 免疫沉淀法…… 62
4.2 制备方法…… 65
4.2.1 硫酸铵沉淀法…… 65
4.2.2 有机溶剂沉淀法…… 68
4.2.3 聚乙二醇沉淀法…… 69
4.2.4 超滤法…… 70
4.2.5 透析法…… 72
4.2.6 离子交换层析和冷冻干燥法简述…… 74
第五章 变性条件下的凝胶电泳 …… 77
5.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 77
5.1.1 原理…… 77
5.1.2 设备…… 79
5.1.3 制胶…… 79
5.1.4 制备样品和上样…… 87

5.1.5 电泳 …… 89
5.1.6 考马斯亮蓝染色 …… 90
5.1.7 银染色 …… 92
5.1.8 干胶 …… 97
5.1.9 讨论 …… 98
5.1.10 安全注意事项 …… 100
5.2 梯度胶 …… 101
5.2.1 引言 …… 101
5.2.2 仪器 …… 101
5.2.3 凝胶的制备 …… 101
5.3 SDS-尿素胶 …… 103
5.3.1 引言 …… 103
5.3.2 制胶 …… 104
5.4 其他方法 …… 105
5.4.1 放射性标记样品的检测 …… 105
5.4.2 分子量的测定 …… 105
5.4.3 蛋白质定量 …… 107
5.4.4 电泳后蛋白质的洗脱 …… 108
第六章 非变性条件下的凝胶电泳 …… 111
6.1 引言 …… 111
6.2 不连续非变性凝胶电泳 …… 112
6.2.1 设备 …… 112
6.2.2 制胶 …… 112
6.2.3 样品制备 …… 117
6.2.4 电泳 …… 118
6.2.5 凝胶染色 …… 119
6.2.6 连续非变性凝胶电泳 …… 120
6.3 相关的方法 …… 120
6.3.1 蛋白质分子量的测定 …… 120
6.3.2 电泳后酶活性的测定 …… 122

第七章　等电聚焦和双向凝胶电泳 …… 124
7.1　等电聚焦 …… 124
7.1.1　原理 …… 124
7.1.2　主要仪器 …… 125
7.1.3　灌制等电聚焦凝胶 …… 125
7.1.4　样品制备和上样 …… 128
7.1.5　等电聚焦电泳 …… 129
7.1.6　聚焦后处理 …… 130
7.1.7　天然等电聚焦电泳的修正方案 …… 130
7.1.8　讨论 …… 131
7.2　固相 pH 梯度等电聚焦电泳 …… 134
7.2.1　简介 …… 134
7.2.2　仪器 …… 135
7.2.3　制备等电聚焦凝胶 …… 135
7.2.4　样品制备和上样 …… 138
7.2.5　等电聚焦电泳 …… 138
7.2.6　聚焦后处理 …… 139
7.2.7　讨论 …… 139
7.3　双向凝胶电泳 …… 140
7.3.1　简介 …… 140
7.3.2　仪器 …… 140
7.3.3　操作步骤 …… 141
7.3.4　讨论 …… 144
第八章　蛋白质的毛细管电泳分析 …… 148
8.1　引言 …… 148
8.2　影响分离效率的几个因素 …… 149
8.3　柱制备技术 …… 151
8.3.1　键合涂层 …… 151
8.3.2　吸附涂层 …… 151
8.4　不同分离条件的影响 …… 152

8.5 毛细管电泳检测器 …… 152
8.6 实验操作 …… 153
8.6.1 实验步骤 …… 153
8.6.2 操作条件选择 …… 153
8.6.3 毛细管区带电泳 …… 155
8.6.4 毛细管等电聚焦 …… 156
8.6.5 毛细管凝胶电泳 …… 159
8.6.6 亲和毛细管电泳 …… 160
8.7 应用实例 …… 161
8.7.1 聚丙烯酰胺涂层毛细管电泳柱的制备 …… 161
8.7.2 毛细管凝胶电泳分离蛋白质 …… 162
8.7.3 毛细管等电聚焦 …… 163
第九章 免疫印迹 …… 166
9.1 引言 …… 166
9.1.1 免疫印迹用膜 …… 167
9.1.2 将蛋白质固定在膜上的其他应用 …… 167
9.2 免疫印迹操作 …… 168
9.2.1 仪器 …… 168
9.2.2 试剂 …… 168
9.2.3 操作步骤 …… 169
9.2.4 其他检测方法的修正方案 …… 178
9.2.5 总蛋白质染色 …… 181
9.2.6 免疫印迹清除 …… 182
9.3 讨论 …… 183
9.3.1 膜的储存 …… 183
9.3.2 转移异常 …… 183
9.3.3 免疫印迹的其他应用 …… 183
第十章 离子交换层析 …… 189
10.1 蛋白质纯化 …… 189
10.1.1 引言 …… 189

10.1.2 方法…… 197
10.2 蛋白质溶液的浓缩…… 210
10.3 批量层析…… 210
第十一章 凝胶过滤层析…… 212
11.1 蛋白质的纯化…… 212
11.1.1 引言…… 212
11.1.2 方法…… 219
11.2 更换蛋白质的缓冲液…… 229
第十二章 亲和层析…… 231
12.1 引言…… 231
12.2 亲和柱的制备…… 232
12.2.1 配基固相化技术…… 234
12.2.2 非特异洗脱的策略…… 236
12.3 特异分离技术…… 238
12.3.1 抗体…… 238
12.3.2 核酸…… 246
12.3.3 凝集素…… 250
12.3.4 染料配基…… 254
12.3.5 固相化金属亲和层析…… 257
12.3.6 疏水作用层析…… 259
第十三章 蛋白质的晶体培养——悬滴结晶…… 264
13.1 引言…… 264
13.2 悬滴结晶法…… 266
13.2.1 结晶原理…… 266
13.2.2 第一阶段操作步骤…… 269
13.3 设计最优结晶方案…… 278
13.3.1 稀溶液基质的微调…… 279
13.3.2 初始筛选的扩展…… 284
13.3.3 蛋白质结晶的灵活性与困难…… 284
第十四章 cDNA 法推断蛋白质的一级结构 …… 287

14.1 引言…… 287
14.2 一般策略…… 287
14.2.1 蛋白质的纯化和肽段氨基酸序列分析…… 287
14.2.2 引物的设计…… 289
14.2.3 用 PCR 扩增目的 cDNA 片段 …… 291
14.2.4 cDNA 的克隆及测序 …… 292
14.2.5 cDNA 序列的分析及蛋白质一级结构的确定…… 292
14.3 PK-120 的纯化及肽段氨基酸序列分析 …… 294
14.3.1 仪器及材料…… 294
14.3.2 PK-120 的纯化 …… 295
14.3.3 分离纯化肽段及测定氨基酸序列…… 296
14.4 部分分解多肽两端有关的 PCR 法筛选 *PK-120* 基因…… 297
14.4.1 仪器及材料…… 297
14.4.2 引物设计…… 298
14.4.3 PCR 扩增 …… 299
14.4.4 凝胶电泳及提取 DNA …… 299
14.4.5 测定碱基序列…… …… …… 299
14.5 *PK-120* cDNA 克隆 …… …… 300
14.5.1 仪器及材料…… 300
14.5.2 杂交反应…… …… 300
14.5.3 cDNA 推测 PK-120 一级结构的特征 …… 301
附录 1 常用化学物质分子量 …… 304
附录 2 一些蛋白质的分子量和等电点 …… 308
附录 3 硫酸铵沉淀剂表 …… 310
附录 4 分光光度曲线 …… 312

第一章　蛋白质分离的准备

1.1　引　　言

本书是关于蛋白质分析和分离的实验室技术操作手册。蛋白质是一种极具多相性的生物大分子，离开其天然环境，蛋白质分子极不稳定，在细胞中和抽提液中蛋白质的性状也不尽相同。蛋白质有多种类型，通过不同的方法我们可区分可溶性蛋白、膜结合蛋白、具有催化功能的蛋白或结构蛋白及转录调节蛋白。

从正常生物基质中提取各种蛋白质均需要有特定的条件。如果不能满足这一条件，蛋白将很快的失去生物学活性，其生物半衰期也将迅速降低。因此，在蛋白质的特性研究中，确定提取条件是一个关键问题。在不同的实验中所遇到的困难各不相同，有的困难是如何抵抗外源性蛋白酶的作用而维持蛋白质的稳定，在有些实验中的困难是如何维持酶的活性。在不同的实验中要针对不同的情况来解决不同的问题。然而对蛋白质研究而言却有着一些共同的参数。在本章中我们来讨论这些参数并希望能给蛋白质实验研究工作提供一些总体的线索和方法。

1.2　缓　冲　液

1.2.1　缓冲液的性质

缓冲液可以抗衡蛋白质溶液中 pH 值的改变，选择合适的缓冲液对于维持一定 pH 值下蛋白质的稳定及保证实验的重复性十分重要[4,20]。pH 和 pK_a 是描述缓冲液的两个重要概念。pH 值是指溶液中氢离子浓度的负对数，$pH = -\log(H^+)$。pK_a 值是溶液中酸解离常数的负对数值。溶液的 pH 值与 pK_a 值越接近，表明溶液的缓冲能力越强，离 pK_a 值越远则缓冲能力越弱。

1.2.1.1 选择缓冲液时要考虑的因素

1）pK_a 值（见表 1.1）

表 1.1 常用缓冲液的 pK_a 值

常用名	缓冲液名	pK_a 值
磷酸盐（pK_a1）		2.15
柠檬酸盐（pK_a1）		3.06
甲酸盐		3.75
琥珀酸盐（pK_a1）		4.21
柠檬酸盐（pK_a2）		4.76
醋酸盐		4.76
吡啶		5.23
柠檬酸盐（pK_a3）		5.40
琥珀酸盐（pK_a2）		5.64
MES	2-(N-吗啉)-乙基磺酸	6.15
二甲胂酸盐	二甲胂酸	6.27
碳酸盐		6.35
BIS-Tris	[双-(2-羟基乙基)亚氨基]三羟甲基氨基甲烷(羟基甲基)甲烷	6.46
ADA	N-(2-乙酰氨基)-亚氨二乙基	6.59
PIPES	哌嗪[双]乙磺酸	6.76
BIS-Tris propane	1，3-双[三羟甲基氨基甲烷（羟基甲基）甲基氨基]丙烷	6.80
ACES	N-(2-乙酰氨基)-2-氨乙基磺酸	6.90
咪唑		6.95
MOPS	2-(N-吗啉代)-丙烷磺酸	7.20
磷酸盐（pK_a2）		7.20
TES	N-三（羟甲基）甲基-2-氨基乙烷磺酸	7.50
Hepes	N-2-羟乙基哌嗪-N′-2乙基磺酸	7.55
HePPS（EPPS）	N-2-羟乙基哌嗪-N′-3-丙基硫酸	8.00
Tris	三羟甲基氨基甲烷	8.06
Tricine	N-三（羟甲基）甲基甘氨酸	8.15

续表

常用名	缓冲液名	pK_a 值
双甘氨肽		8.25
二甘氨酸	N，N-双（羟乙基）甘氨酸	8.35
TAPS	三[羟甲基]甲氨基丙烷磺酸	8.40
硼酸盐		9.23
氨		9.25
CHES	环已氨基乙烷磺酸	9.55
甘氨酸		9.78
碳酸盐（pK_a2）		10.33
CAPS	3-(环已氨基)丙磺酸	10.40
磷酸盐（pK_a3）		12.43

引自 Calbiochem "Buffers" 手册或 Blanchard（1984）

2）pK_a 值随温度而变

3）稀释后的 pK_a 值的改变

4）溶解度

5）与溶液中其他成分的相互作用（如金属离子和酶）

6）价格

7）紫外吸收值

8）对生物膜的通透性

1.2.1.2 一般原则

1）有条件时，应对 pK_a 相近的一些缓冲液进行试验，以避免有的缓冲液与所研究的蛋白质之间发生不良的相互作用[1]。

2）当选定一种缓冲液之后，一般使用其最低的浓度以避免非特异性的离子强度的影响。通常以 50mmol/L 的缓冲液浓度作为试验起始浓度。

3）当缓冲液 pK_a 值的变化超过 1 个 pH 单位时其有效的缓冲能力明显降低。而许多酶在极限 pH 值时往往发生不可逆的变性[21]。

4）大多数动物细胞在37℃的生理状况下的pH值为7.0～7.5，而在温度下降至接近0℃时可达8.0[19]。

5）要根据所选用的分离方法选用缓冲液：凝胶过滤方法，大多数缓冲液均可适用。阴离子交换层析，阳离子缓冲液首选Tris缓冲液。阳离子交换和羟基磷灰石层析，阴离子缓冲液首选磷酸盐缓冲液[1]。

6）混合缓冲液在一定的离子强度下往往具有更宽的缓冲范围[6]。

7）在低温时缓冲液和冰点溶剂的情况可参阅文献[7]。

8）所采用的化学试剂应达到试剂级或更高纯度。

1.2.2 缓冲液配制

1）通常，应当在缓冲液所使用的温度下调节溶液的pH值，这就要求在工作温度下，通常为4℃时校正pH电极。然而在实际情况中，是在室温下调节缓冲液的pH值，这时我们应当注意到温度对pH值的影响是非常大的，尤其是Tris缓冲液，25℃时pK_a值为8.06，而0℃时pK_a值为8.85[1]。实验中使用的溶液应当在所有的成分（如EDTA，DTT，Mg^{2+}等）均加入后再测pH值，因为这些成分的加入可能改变溶液的pH值。

2）除非特定情况，一般使用HCl或NaOH，KOH来调节缓冲液的pH值。

3）在反应中如果要彻底避免一价，二价或三价的金属离子的干扰，则用羟化四甲铵来调节缓冲液的pH值，因为羟化四甲铵的碱性与NaOH，KOH相当。

4）无论是质子化还是非质子化的缓冲液，只要有所需的同浓度两种溶液可根据常规的培制表或在pH剂的检测下，或通过计算很容易配制成功。

例如：配制pH5.8～7.8的磷酸盐缓冲液

储存液A（0.2 mol/L NaH_2PO_4）：27.6g NaH_2PO_4溶于1L

去离子水中

储存液 B（0.2 mol/L Na_2HPO_4）：28.4g Na_2HPO_4 溶于 1L 去离子水中

pH	%A	%B	pH	%A	%B
5.8	92.0	8.0	6.9	45.0	55.0
5.9	90.0	10.0	7.0	39.0	61.0
6.0	87.7	12.3	7.1	33.0	67.0
6.1	85.0	15.0	7.2	28.0	72.0
6.2	81.5	19.5	7.3	23.0	77.0
6.3	77.5	22.5	7.4	19.0	81.0
6.4	73.5	26.5	7.5	16.0	84.0
6.5	68.5	31.5	7.6	13.0	87.0
6.6	62.5	37.5	7.7	10.5	89.5
6.7	56.5	43.5	7.8	8.5	91.5
6.8	51.0	49.0			

注意：这一pH值仅是预测值，在实验中须用pH计检测

1.2.3 浓度对缓冲液 pH 值的影响

1）通常我们将缓冲液配制成 10× 和 100× 的储存液，以使储存液的体积变小，并允许加入抑菌剂（如 0.02% 的叠氮化钠），抑菌剂在使用时可进一步的稀释[19]。以下一些缓冲液在 0℃ 时可出现饱和：

MES	0.65mol/L	HEPES	2.3mol/L
PIPES	2.3mol/L	Tris	2.4mol/L
MOPS	3.0mol/L	Phosphate	2.5mol/L
TES	2.6mol/L		

2）在稀释高浓度的储存液时有可能会改变溶液的 pH 值。例如，pH6.7 的 0.1mol/L 的 NaH_2PO_4 和 0.1mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液在 10 倍稀释后 pH 为 6.9，在 100 倍稀释后 pH 变为 7.0[21]。

3）Tris 缓冲液的 pH 值在每 10 倍稀释后降低 0.1[4]。

1.2.4 某些缓冲液使用时的注意事项

在蛋白溶液的所有成分中缓冲液往往以最高浓度存在，这样就对蛋白质或酶的活性有显著的影响。缓冲液中的无机成分（磷酸盐，硼酸盐，碳酸盐）可以与酶或其底物反应，从而影响酶的活性。更为严重的是一些缓冲液可与二价或三价金属离子形成配位复合物，释放出质子，降低了溶液的 pH 值；或螯合金属离子产生不溶性复合物。因此，在研究一些具有金属离子要求的酶时，需采用与金属结合力低的缓冲液，如 PIPES，TES，HEPES 和 CAPS 等[1]。以下介绍几种常用缓冲剂的性质：

1）磷酸盐：①在 pH 8～11 范围内适用；②可与多价阳离子结合形成沉淀；③抑制多数酶的活性，包括激酶、磷酸化酶、脱氢酶和以磷酸酯为底物的酶[1]；④溶液的 pK 值随缓冲液的稀释而变。

2）柠檬酸盐可与一些蛋白结合并形成金属复合物[19]。

3）二甲胂酸盐有毒性[19]。

4）碳酸盐溶解度较低，由于 CO_2 影响其酸碱平衡，因此应在密闭系统中操作[1]。

5）ADA 在波长为 260nm 有吸收值，并可结合金属离子[9]。

6）MOPS 干扰 Lowry 法蛋白定量，但却不影响 Braford 或 Bicinchoninic Acid 法蛋白定量（见第三章）。

7）Hepes：①干扰 Lowry 法蛋白定量，但却不影响 Braford 或 Bicinchoninic Acid 法蛋白定量（见第三章）；②由于带有哌嗪基的缓冲液（如 Hepes，EPPS[9]）在多数情况下可形成自由基团，因而在氧化还原反应中应避免使用这些溶液[10]。

8）Tris：①在 pH7.0 以下缓冲能力弱；②具有一个可能引起反应的伯胺基团；③参与多种酶反应例如可被碱性磷酸酶催化；④可穿过生物膜；⑤受缓冲液的浓度和使用温度影响。

9）硼酸盐可与单糖、多糖、核酸、嘌呤核苷酸以及甘油形成复合物。

1.2.5 防止缓冲液受污染

1）磷酸盐缓冲液很容易受微生物污染，然而，1mol/L的磷酸盐溶液却不易被细菌污染[18]。

2）无菌过滤可有效的防止细菌和真菌的污染，尤其在pH 6～8时[1]。

3）为了防止储存缓冲液的污染，可加入0.02%(3mmol/L)的叠氮化钠，这一浓度下通常不会干扰蛋白的活性。

4）将缓冲液放在冰箱里保存可有效的减少细菌的污染。

1.2.6 水的纯度

在所有实验使用的每一种溶液中，水是最重要的成分。在蒸馏及去离子过程中可去除许多杂质成分，但仍可能有痕量的杂质存在并影响蛋白溶液。因而在实验研究中需要利用高纯度水处理系统进行水的纯化[8]。

1.3 盐、金属离子和螯合剂

1.3.1 离子强度

通常用0.1～0.2mol/L KCl或NaCl来模拟生理状况下的离子强度[16]。

1.3.2 二价阳离子

如果缓冲液和二价阳离子如Ca^{2+}或Mg^{2+}之间形成复合物，则缓冲液对氢离子的缓冲能力将明显的降低。另外，金属离子的沉淀可丧失酶反应的活性，因此应当注意缓冲液对金属离子的亲和性。

1）如果蛋白质的活性或稳定性需要金属离子维持，这时应避免使用Tris缓冲液。在100mmol/L Tris缓冲液中加入

2mmol/L Mn^{2+} 则 29% 的金属离子被螯合[15]。

2）为了使实验具有可重复性，在操作 ATP 结合酶时，加入 Mg^{2+} 使其浓度超过 ATP 浓度可确保所有的 ATP 呈现 Mg.ATP 形式[23]。

1.3.3 螯 合 剂

为了避免金属离子的干扰，应在溶液中加入特异金属离子的螯合剂。但应注意金属离子螯合剂同时能使金属蛋白酶失活。

1）为了去除缓冲液中存在的痕量重金属离子，可在其中加入 0.1～5mmol/L 的 EDTA[19]。

2）最常用的金属离子螯合剂为 EDTA 和 EGTA。EDTA 对大多数金属离子有非特异的亲和性；而 EGTA 对 Ca^{2+} 有很强的亲和性，明显高于对 Mg^{2+} 的亲和力，使用 EGTA 可有效的去除溶液中的 Ca^{2+}[1]。

3）邻二氮杂菲（o-phenanthroline），可螯合 Zn^{2+}，而间-邻二氮杂菲（m-phenanthroline）则不行[22]。

1.4 还 原 剂

1.4.1 总 则

在细胞中有许多种还原成分，如谷氨酰胺可防止蛋白质氧化。但是一旦细胞破碎，由于和氧的接触以及稀释作用而引起抗氧化成分的减少，使许多蛋白质被氧化而失去活性，尽管有时可通过减少巯基的存在使其恢复活性。但二价阳离子的存在仍可加速二硫键的形成[19]。

1.4.2 特殊情况

1）常用的二巯基乙醇以溶液状态储存在 4℃，其使用浓度应为 5～20mmol/L。在加入缓冲液中 24h 内，二巯基乙醇被氧化，其后可加速蛋白的失活[19]。

2）DTT 也被广泛使用，储存液必须置于 -20℃，DTT 使

用浓度为 0.5～1.0mmol/L，因氧化而形成稳定的分子内二硫键，并不危及蛋白质的巯基。

3）一个好的策略是在蛋白质制备过程中用 1:1000 稀释的二巯基乙醇（浓度大约 12mmol/L），而在长期储存时加入 1～5mmol/L DTT[19]。

4）注意有些酶对还原作用很敏感[18]。

1.5 去 垢 剂

在膜蛋白的提取和纯化过程中常用去垢剂，在去垢剂的帮助下使膜蛋白溶解。本节涉及了去垢剂的分类及不同种类去垢剂对膜蛋白的溶解和稳定作用。

去垢剂为双极性分子，可在水中溶解。除了胆酸盐以外，去垢剂分子通常是由线形或带有分枝的碳氢化合物尾部和结构各不相同的亲水性头部组成。去垢剂的一个重要的特性是可以形成分子团结构，成簇的去垢剂分子将亲水性的头部向外。溶解的膜蛋白与去垢剂分子结合成团，膜蛋白的疏水区或穿膜区被去垢剂分子覆盖，使其能与水性缓冲液相溶。去垢剂的临界胶束浓度(CMC) 是去垢剂与膜蛋白结合形成微胶粒时去垢剂的最低浓度。高 CMC 值的去垢剂在稀释时可形成单体分子，这样可通过透析迅速的去除去垢剂分子。另外，去垢剂形成的微胶粒的分子量对于透析，凝胶过滤色谱及非变性电泳都是非常重要的。温度、pH 值、离子强度、多价金属离子的存在，以及有机溶剂和去垢剂的纯度均可影响去垢剂的 CMC 值。

尽管高浓度的去垢剂往往引起蛋白的变性，但是在去除去垢剂后可使蛋白质复性，为了避免蛋白质变性，可使用浓度低于 0.1% 的非离子型去垢剂[19]。

1.5.1 去垢剂的分类

表 1.2 为去垢剂的特性。

表 1.2　常用去垢剂特性

去垢剂	分子量	临界分子团浓度	溶解时的浓度	分子团大小
SDS	288.5[d]	7～10mmol/L，0.23%[d]		18kDa
LiDS	272.4	6～10mmol/L，0.2%[a]	>10mg/mg 蛋白[a]	
胆酸钠	431[f]	3～10mmol/L，0.2%[f]		1.8kDa
脱氧胆酸钠	433[f]	1～2mmol/L，0.57%[f]		4.2kDa
Triton X-100	约 628[e]	0.3mmol/L，0.02%[c]	0.2～0.6mg/mg 蛋白[b]	90kDa
Triton X-114	约 543[d]	0.35mmol/L，0.003～0.02%[d]	见 5.2	
NP-40	约 603[e]	15～25mmol/L，0.5%[e]		90kDa
辛葡糖苷(Octylglucoside)	292.4[e]	60μmol/L，0.006%[f]	20～45mmol/L[a]	8.0kDa
Tween 20	1230[f]	10μmol/L，0.0013%[f]		
Tween 80	1310[f]	90μmol/L，0.01%[e]		76kDa
Brij 35	1200[f]	4～8mmol/L，0.5%[f]		49kDa
CHAPS	614.9[d]	0.3mmol/L，0.011%	6～10mmol/L[a]	6.0kDa
Zwittergent 3～14	364[d]			30kDa

a：引自文献[2]；b：引自文献[12]；c：引自文献[13]；d：引自文献[5]；e：引自文献[14]；f：引自文献[11]

1.5.1.1 离子型去垢剂

离子型去垢剂包括一个带电荷的头部，带阳离子电荷的为阳离子去垢剂，带阴离子电荷的为阴离子去垢剂。这一类型去垢剂的缺点是使蛋白质高度变性，但是使用这种类型的去垢剂可使蛋白以单体的形式被分离，对于测定蛋白的分子量较为方便。

（1）十二烷基硫酸钠（SDS）或十二烷基硫酸锂（LiDS）

这两种阴离子型去垢剂，LiDS 的优点为在 4℃ 可溶解，而 SDS 则不溶。要使 1mg 的膜蛋白完全溶解，需要用 10mg 或更多的 LiDS[2]。值得注意的是在含钾离子的缓冲液和硫酸铵的缓冲液中使用这种去垢剂在室温下易发生沉淀。溶液中盐离子的浓度可明显的影响去垢剂的临界胶束浓度（CMC），如 SDS，当 NaCl 浓度在 0～0.5mol/L 时，其 CMC 值则从 8mmol/L 降至 0.5 mmol/L[14]。

（2）胆酸钠和脱氧胆酸钠

胆酸钠和脱氧胆酸钠为阴离子型去垢剂，与其他离子型去垢剂相比其对蛋白质的变性作用较弱[11]。去垢剂浓度高于临界胶束浓度（CMC）可以形成两类分子团，初级胶束（包括 9 个分子）和二级胶束（包括 9～60 个分子）。与其他去垢剂不同的是，在 CMC 值以上，游离的胆酸盐和脱氧胆酸盐单体分子可累积，这类去垢剂分子的 pK_a 值为 8～9，在 pH 低于 7.5 时，去垢剂分子的酸性形式将发生沉淀。二价的阳离子也可使脱氧胆酸钠的沉淀。

1.5.1.2 非离子型去垢剂

非离子型的去垢剂带有非极性的亲水头部，对蛋白和蛋白间的相互作用干扰较弱，对于分离功能性的蛋白复合物较为有利。与离子型去垢剂相比其对蛋白的变性作用较弱，然而在这种去垢

剂中蛋白易发生聚集。

(1) Triton X-100

在1%～3%浓度的 Triton X-100 下许多蛋白质活性保持不变。对于膜脂蛋白须用 10 倍或更高浓度的 Triton X-100 来溶解。Triton X-100 在 280nm 处有强的吸收值。

(2) Triton X-114

温度在 20℃以上时蛋白质溶液中加入 2% 的 Triton X-114 可使蛋白质从去垢剂相和液相中分离，可溶性的蛋白质仍在液相中，而膜蛋白则进入去垢剂相中[3]。

(3) NP-40

NP-40 在 280nm 处有弱的吸收值，在蛋白分离中使用较方便。

(4) 辛葡糖苷（Octylglucoside，OG）

与 Triton X-100 相比 OG 具有很多的优点，20～45mmol/L OG 即足够用来溶解膜蛋白，OG 具有高的 CMC 浓度，因此和 Triton 相比很容易从溶液中去除。

(5) Tween-20

Tween-20 通常在固相免疫细胞化学反应（ELISA，RIA，免疫印迹）中用来阻断非特异性蛋白质的相互作用。Tween-20 具有低的 CMC 值。

1.5.1.3 两性去垢剂

两性去垢剂带有正、负离子的头部，与非离子去垢剂相比可减少蛋白质和蛋白质间互相作用的干扰及离子型去垢剂使蛋白质变性的作用。

1) CHAPS：CHAPS 不干扰离子交换色谱和等点聚焦电泳。含 CHAPS 的蛋白溶液可以冻存。

2) Zwittergent 3-14。

1.5.2 蛋白质溶解的初始操作步骤

1.5.2.1 实验步骤[13]

1）准备细胞膜的粗提成分，在蛋白质浓度为 10mg/ml 的 50mmol/L 缓冲液中，加入 0.15mol/L KCl，4℃保存；
2）用同样的缓冲液配制去垢剂储存液（10%，w/v）；
3）分别在含 0.01%、0.03%、0.1%、0.3%、1%、3% 去垢剂的缓冲液中稀释细胞膜的粗提物，使其浓度约为 5mg/ml；
4）4℃震摇 1h（避免气泡产生）；
5）4℃ 100 000×g 离心 1h；
6）吸弃上清，加入同体积、同浓度的含去垢剂的缓冲液；
7）每一步需测定蛋白质浓度（见第三章）；
8）每一步需测定酶活性。

1.5.2.2 一般规则

1）最合适的使蛋白质溶解和保持蛋白质活性的去垢剂浓度可在后续的实验中继续使用。如果用不同的去垢剂均不能获得较好的结果，可探索将多种去垢剂混合使用。若蛋白的活性很低，可在溶液中加入 20%～50% v/v 的甘油保护。还需加入还原剂（1mmol/L DTT 或 5 mmol/L 二巯基乙醇），螯合剂（1mmol/L EDTA）或蛋白酶抑制剂（75μg/ml PMFS，20mg/ml Leupeptin 或 pepstatin；见 1.7）。
2）有些时候，蛋白质如果在 KCl 溶液中不溶解，往往可溶于 0.1～0.2mol/L 的磷酸盐溶液中。
3）蛋白的溶解一般发生在去垢剂的浓度达到 CMC 值时[13]。
4）1981 年 Bordier 使用了非离子去垢剂 Triton X-114 在分离膜蛋白的第一步中（这一步可迅速的分离膜蛋白以避免溶酶体蛋白酶的作用），然后通过离子交换色谱可去除

去垢剂。

5）在高盐（0.15～2mmol/L KCl），高或低的 pH 值，以及高浓度的螯合剂（10mmol/L EDTA 或 EGTA），或变性剂如尿素或 6～10mol/L 的盐酸胍可破坏膜制品中的膜蛋白和膜之间的相互作用[17]。

6）对可溶性蛋白的定义还不是很清楚，由于受溶解度及温度的影响，有些蛋白质经过 105 000×g 离心 1h 后，仍可留在上清中。这时可试用凝胶过滤层析法分离[13]。

1.6 蛋白质的环境因素

1.6.1 表面效应

蛋白质的稀溶液经常迅速的失活，可能是由于玻璃容器的表面使蛋白质变性的结果。这一作用可在溶液中加入高浓度其他蛋白如牛血清白蛋白（BSA）来防止。在理想情况下，为了避免加入“污染”蛋白，应将稀释后的蛋白溶液立即浓缩。然而，酶的反应通常是在较低的浓度 1μg/ml 下进行，因而加入 BSA 是十分必要的。另外，由于玻璃表面的非特异性吸附可损失大量的纯化蛋白（5cm^2 的玻璃表面可吸附 1μg 的蛋白），在溶液中加入 BSA 时可大大降低这一作用。通常在酶活性测定中至少加入 0.1mg/ml BSA，而蛋白质储存液中则可加入 10mg/ml BSA[19]。

1.6.2 温　　度

尽管有些“不耐低温的酶”（如线粒体 ATP 酶）在低温下易失活，但大多数的酶在温度升高 10℃（如从 18℃升至 28℃时）酶反应速度会增加一倍。超过 30℃～40℃，蛋白质极不稳定，大多数蛋白质失活，但是一些蛋白质甚至在煮沸下仍有活性（如细菌碱性磷酸酶）。

1.6.3 储　　存

作为一个原则，蛋白质的半衰期在低温下可延长。通常要依据蛋白的用途来决定其储存条件是在4℃、－20℃、－80℃或液氮（－200℃）下。

短期储存时（从一天至一周），蛋白溶液在以下情况可储存于4℃。①蛋白质的活性功能（如酶活性，配体结合等）在这一时期内不降低。②在双相电泳中未见蛋白质降解。③在20 000×g离心10min未见明显的沉淀（沉淀的出现意味着蛋白质的变性）。

长期储存时（超过一周），要根据不同蛋白质的稳定性来选择合适的方法。在确定某种方法大量保存某种蛋白质之前，应当实验以下几种不同的方法。

1）一种最简单的方法是在硫酸铵溶液中将沉淀以悬浮形式保存于4℃。

2）另一种方法，硫酸铵沉淀蛋白质后20 000×g离心20min，在液氮中冷冻然后储存于－80℃或更低的温度下。

3）如果想冻存蛋白质，必须按照以下的操作以最大限度的减少蛋白质溶液中各相的分离以避免沉淀的发生或局部缓冲液浓度的增高而引起pH值在±3个单位中的波动。高浓度的蛋白（2mg/ml）可提供自我缓冲作用，在液氮中冷冻蛋白可减少冻结所需的时间[19]。在液氮中冷冻蛋白质的合适的方法是用巴斯德滴管或自动加样枪将50μl的蛋白质液体小滴滴入液氮中。滴入的速度要慢，以防止蛋白质溶液未形成小滴。对大体积的蛋白质溶液的冷冻，可使用peristalic泵或自动滴液器来操作。在完成后，从液氮中将这些沉淀舀出迅速放入储存管中以防液滴的溶解，然后将其储存于－80℃或液氮中。在实验中可方便的倒出所需用量的蛋白质液滴从而避免多次反复

. 冻溶所引起的蛋白质损害。

4）最后的办法是将蛋白质以冻干的粉末保存。对许多蛋白质而言，冻干是长期储存最安全和最有效的办法，但是对极少数蛋白质来说一个明显的缺点是失活和不能再溶解。因此，在将所有的蛋白质以此方法储存之前必须取少量的进行试验。

5）通常，甘油可有效的提高蛋白的稳定性。先配置成50%的甘油储存液，工作液中含20%～30%的甘油不会引起操作困难[19]。在蛋白溶液中加入甘油可使溶液在低温非冷冻状态下保存。

1.7 蛋白酶抑制剂

破碎细胞提取蛋白质的同时可释放出蛋白酶，这些蛋白酶需要迅速的被抑制以保持蛋白质不被降解。在蛋白质提取过程中，需要加入蛋白酶抑制剂以防止蛋白水解。以下列举了5种常用的蛋白酶抑制剂和他们各自的作用特点，因为各种蛋白酶对不同蛋白质的敏感性各不相同，因此需要调整各种蛋白酶的浓度。由于蛋白酶抑制剂在液体中的溶解度极低，尤其应注意在缓冲液中加入蛋白酶抑制剂时应充分混匀以减少蛋白酶抑制剂的沉淀。在宝灵曼公司的目录上可查到更完整的蛋白酶和蛋白酶抑制剂表。

1.7.1 常用抑制剂

1.7.1.1 PMSF

1）抑制丝氨酸蛋白酶（如胰凝乳蛋白酶，胰蛋白酶，凝血酶）和巯基蛋白酶（如木瓜蛋白酶）；

2）10mg/ml溶于异丙醇中；

3）在室温下可保存一年；

4）工作浓度：17～174μg/ml（0.1～1.0mmol/L）；

5）在水液体溶液中不稳定，必须在每一分离和纯化步骤中加入新鲜的PMSF。

1.7.1.2 EDTA

1）抑制金属蛋白水解酶；
2）0.5mol/L 水溶液，pH8～9；
3）溶液在 4℃稳定六个月以上；
4）工作浓度：0.5～1.5mmol/L（0.2～0.5mg/ml）；
5）加入 NaOH 调节溶液的 pH 值，否则 EDTA 不溶解。

1.7.1.3 胃蛋白酶抑制剂（pepstatin）

1）抑制酸性蛋白酶如胃蛋白酶，血管紧张肽原酶，组织蛋白酶 D 和凝乳酶；
2）1mg/ml 溶于甲醇中；
3）储存液在 4℃一周内稳定，－20℃稳定 6 个月；
4）工作浓度：0.7μg/ml（1μmol/L）；
5）在水中不溶解。

1.7.1.4 亮抑蛋白酶肽（leupeptin）

1）抑制丝氨酸和巯基蛋白酶，如木瓜蛋白酶，血浆酶和组织蛋白酶 B；
2）10mg/ml 溶于水；
3）储存液 4℃稳定一周，－20℃稳定 6 个月；
4）工作浓度 0.5mg/ml。

1.7.1.5 胰蛋白酶抑制剂（aprotinin）

1）抑制丝氨酸蛋白酶，如血浆酶，血管舒缓素，胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶；
2）10mg/ml 溶于水，pH 7～8；
3）储存液 4℃稳定一周，－20℃稳定 6 个月；
4）工作浓度：0.06～2.0μg/ml（0.01～0.3μmol/L）；
5）避免反复冻融；

6）在 pH>12.8 时失活。

1.7.2 蛋白酶抑制剂混合使用

35μg/ml PMSF …… 丝氨酸蛋白酶抑制剂

0.3mg/ml EDTA …… 金属蛋白酶抑制剂

0.7μg/ml 胃蛋白酶以致剂（Pepstatin）…酸性蛋白酶抑制剂

0.5μg/ml 亮抑蛋白酶肽（Leupeptin）…广谱蛋白酶抑制剂

参 考 文 献

[1] Blanchard, J. S. 1984. Buffers for Enzymes. Meth. Enzymol., 104: 404～414.

[2] Keesey, J. ed. 1987. Boehringer Mannheim Catalog: Biochemica Information. Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis.

[3] Bordier, C. 1981. Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. J. Biol. Chem, 256: 1604～1607.

[4] Gueffroy, D. E. ed. 1975. Calbiochem Buffers: A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems.

[5] Calbiochem Biochemical/Immunochemical Catalog. 1989.

[6] Ellis, K. J. and J. F. Morrison. 1982. Buffers of Constant Ionic Strength for Studying pH-Dependent Processes. Meth. Enzymol. 87: 405～426.

[7] Fink, A. L. and M. A. Geeves. 1979. Cryoenzymology: The study of Enzyme Catalysis at Subzero Temperatures. Meth. Enzymol. 63: 336～370.

[8] Ganzi, G. C. 1984. Preparation of High-Purity Laboratory Water. Meth. Enzymol. 104: 391～403.

[9] Good, N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Lzawa and R. M. M. Singh. 1966. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. Biochem. 5: 467～477.

[10] Grady, J. K., N. D. Chasteen and D. C. Harris. 1988. Radicals from "Good' s" Buffers. Anal. Biochem. 173: 111～115.

[11] Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies: A Laboratory Mannal. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Hardor.

[12] Helenius, A. and K. Simons. 1975. Solubilization of Memdranes by Detergents. Biochim. Biophys. Acta 415: 29～79.

[13] Hjelmeland, L. M. and A. Chrambach. 1984. Solubilization of Functional Mem-

brane Proteins. Meth. Enzymol. 104: 305～318.

[14] Helenius, A., D. R. McCaslin, E. Fries and C. Tanford. 1979. Properties of Detergents. Meth. Enzymol. 56: 734～749.

[15] Morrison, J. F. 1979. Approaches to Kinetic Studies on Metal-Activated Enzymes. Meth. Enzymol. 63: 257～294.

[16] O' Sullivan, W. J. and G. W. Smithers. 1979. Stability Constants for Biologically Important Metal-Ligand Complexes. Meth. Enzymol. 63: 294～336.

[17] Van Renswoude, J. and C. Kempf. 1984. Purification of Integral Membrane Proteins. Meth. Enzymol. 104: 329～339.

[18] Schleif, R. F. and P. C. Wensink. 1981. Practical Methods in Molecular Biology. New York: Springer-Verlag. pp. 77～78, 177～178.

[19] Scopes, R. K. 1982. Protein Purification: Principles and Practices. New York: Spring-Verlag.

[20] Stryer, L. 1988. Biochemistry, Third Edition. New York: W. H. Freeman and Company.

[21] Tipton, K. F. and H. B. F. Dixon. 1979. Effects of pH on enzymes. Meth. Enzymol. 63: 183～243.

[22] Todhunter, J. A. 1979. Reversible Enzyme Inhibition. Meth. Enzymol. 63: 383～411.

[23] Watts, D. C. 1973. Creatine Kinase. In P. D. Boyer ed. The Enzymes, Vol. 8. New York: Academic Press. pp. 383～455.

陈 谦 汪家政

第二章　蛋白质的提取和溶解

2.1 引　言

为了纯化细胞蛋白质，采用有效的方法进行细胞破碎和固液分离是必要的。它是全过程的第一步，通常是将处于细胞不同位置的待纯化蛋白释放出来，溶入已知成分的溶液内。该步骤是目的蛋白初级分离纯化阶段的重要环节，它直接影响产物的回收率，也可能影响产物的纯度。

目前已建立很多破碎细胞，释放细胞内容物的方法。根据作用方式不同，基本可以分为两大类：机械法和非机械法。传统的机械法包括匀浆、研磨、压榨、超声等；常见的非机械法包括渗透、酶溶、冻融、化学等；其中一些新的方法也在不断发展和完善，如激光破碎、冷冻喷射、相向流撞击等[23]。每一种方法都有它的适用范围及优缺点，选择的标准常常要依靠过去经验和实践比较。选择的原则是该方法不影响目的蛋白或产物的结构和功能，或者说，采用的方法可以避免造成目的蛋白或产物的变性或失活。常见组织和细胞的破碎和溶解一般都采用传统的标准方法，有时为了增加活性蛋白的回收率或针对产物蛋白的特性尝试或筛选细胞破碎和溶解的方法也很有必要。此类方法的原理和细节可以参阅 1990 年出版的酶学方法（英文）182 卷。

有时细胞破碎后，某些蛋白质并不能被释放进入溶液，例如在细菌中形成的包涵体蛋白。包涵体通常由于诱导细菌高水平表达单一蛋白，造成不溶性积聚而产生。纯化包涵体蛋白必须在细胞破碎后，将其转变成可溶形式，在纯化前或纯化过程中还需恢复目的蛋白的活性。基本策略和方法本章将做介绍。

2.2 细胞破碎和蛋白质溶解

经典的细胞蛋白质分离纯化流程由下述主要步骤组成：清洗组织或细胞；裂解细胞；离心除去膜组分等获得可溶性蛋白质(目的蛋白是膜蛋白时用去垢剂处理)；通过离心、层析、电泳等方法进一步纯化，得到产物蛋白。

细胞破碎前，组织一般用缓冲盐液洗去残留血液和污染物；培养细胞通常用缓冲盐液混悬后离心，除去残留培养液等。细胞破碎获得的抽提物称为匀浆。匀浆根据不同需要可以在12 000×g离心 10min 到 100 000×g 离心 1h 范围内离心。沉淀主要含有膜组分等，弃去。上清含有目的蛋白称为粗提物。如果粗提物有漂浮颗粒，可用纱布或玻璃纤维滤去后再进一步纯化。

各种组织和细胞的常用裂解方法列于表 2.1。

表 2.1 各种组织细胞破碎方法

细胞破碎方法	组织种类
旋刀式匀浆	大多数动、植物组织
手动式匀浆	柔软的动物组织
超声	细胞混悬液
高压匀浆	细菌、酵母、植物细胞
研磨	细菌、植物细胞
高速珠磨	细胞混悬液
酶溶	细菌、酵母
去垢剂渗透	组织培养细胞
有机溶剂渗透	细菌、酵母
低渗裂解	红细胞、细菌
冻融裂解	培养细胞

2.2.1 匀　　浆

匀浆是机体软组织破碎最常用的方法之一。它的工作原理是通过固体剪切力破碎组织和细胞，释放蛋白进入溶液。市售的匀浆器主要有四类，刀片式组织破碎匀浆器、内切式组织匀浆器、玻璃匀浆器和用于规模生产的高压匀浆器。玻璃匀浆器的匀浆头

(杵) 有玻璃制的，也有特夫隆制的，既可以手动也可以电动[9,23,24,28]。高压匀浆器的工作本节暂不涉及。由于匀浆过程中蛋白质被蛋白酶降解的可能性较小，所以匀浆是简便、迅速和风险小的组织破碎方法，是实验室首先考虑的方法之一。

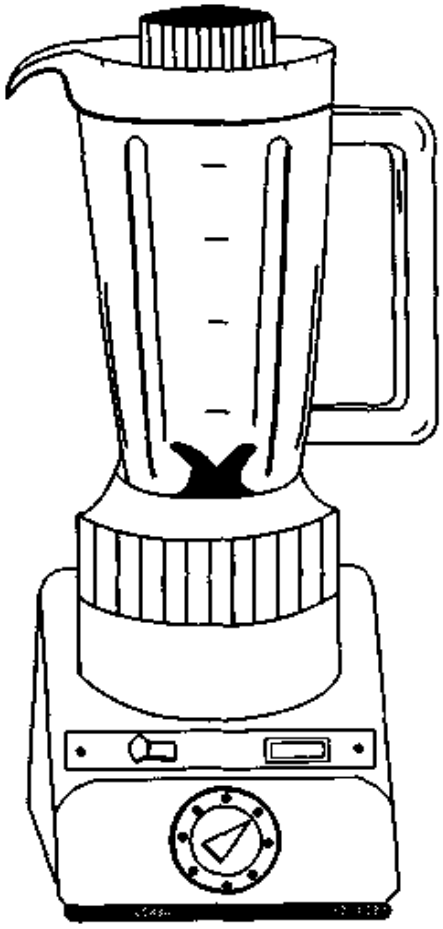


图 2.1 匀浆器

2.2.1.1 操作步骤

1) 用组织剪或手术刀迅速将清洗的组织分离成适宜的小块，如 $1cm^3$；
2) 每体积湿重组织通常加 3～5 倍体积预冷的匀浆缓冲液至匀浆容器内；

3）制备匀浆：①电力驱动的玻璃匀浆器以 500～1500r/min 的速度，匀浆 3～6 次，每次 5～10s。②手动玻璃匀浆器匀浆 10～20 次。③刀片式组织破碎匀浆器和内切式组织匀浆器以 1000～3000r/min 的速度，高速匀浆 3 次，每次 20～30s，次间暂停几秒。

2.2.1.2 注　　意

1）玻璃匀浆器杵和臼之间的空隙应为 0.35～0.70mm。电动玻璃匀浆器常用于匀浆肝、心、肌肉等软组织的匀浆；手动玻璃匀浆器常用于培养细胞和脑组织等的匀浆。
2）匀浆过程应注意维持低温。玻璃匀浆器可外置冰水浴，其他匀浆容器可预冷或在冷室内匀浆。
3）匀浆时所需匀浆缓冲液的体积在不同条件下可有很大差别，有时甚至可为湿重组织体积的 9～10 倍。
4）匀浆的效果可以用相差显微镜观察组织细胞状况评估，也可定量单位湿重组织释放的蛋白质含量监控。

2.2.2 超　　声

输入高能超声波可以破碎细胞，其机理可能与强声波作用溶液时，气泡产生、长大和破碎的空化现象有关。空化现象引起的冲击波和剪切力使细胞裂解。超声破碎的效率取决于声频、声能、处理时间、细胞浓度及细胞类型等。

使用超声破碎必须注意的是控制强度在一定限度，即刚好低于溶液产生泡沫的水平。因为产生泡沫会导致蛋白质变性。过低的强度将降低破碎效率。最好在正式实验前用多余样品试超，调校超声波发生器在稍低于产生泡沫的强度。正式超声样品时强度只能在预定位置附近做微小调整。

超声破碎在处理少量样品时操作简便，液量损失少，适于实验室应用。但是超声波产生的化学自由基团能使敏感的活性物质变性失活，噪声令人难以忍受，大容量装置声能传递、散热均有

困难。

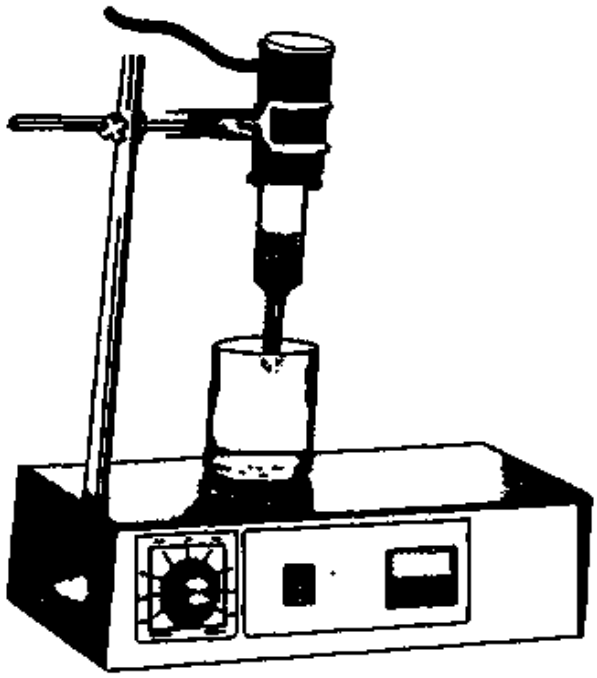


图 2.2　超声波细胞裂解仪

2.2.2.1　操作步骤

1）清洗后的组织用搅切机切碎成小块，混悬在至少两倍体积的缓冲液内；洗去培养液的细胞（细菌），混悬在至少两倍体积的缓冲液内；

2）将超声探头没入混悬液内，进行超声破碎。一般总超声时间约 2min，分为几个周期，如 4×30s，周期之间让样品在冰浴中冷却。

2.2.2.2　注　　意

1）超声破碎常用于多种细菌和脑组织匀浆。根据具体情况可以适当延长破碎时间，一般不宜超过 10min，但最多处理 1g 细菌或组织。

2）用相差显微镜检查细胞破碎的效率。

3）超声破碎需提醒注意的一点是在整个过程中探头要保持低于混悬液表面。

4）具体细节可参阅文献［7，13，29］介绍的实例。

2.2.3 高压匀浆

细胞悬液从高压室的环状隙高速喷射到静止的撞击环上，被迫改变方向经出口管流出。此过程中细胞经历了高速造成的剪切、碰撞及高压到常压的变化，从而破碎释放内含物。增加压力或增加破碎次数都能提高破碎效率，但压力增加到一定程度零部件磨损较大。通常撞击环较易磨损应定期更换。为防止污染，使用前后高压室至出口管需彻底清洁。

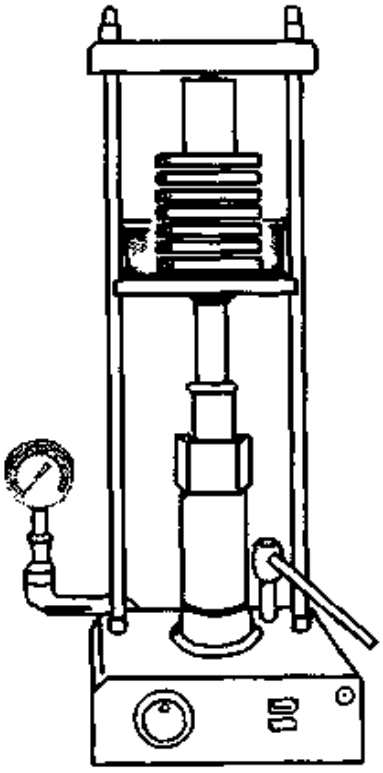


图 2.3 高压匀浆器

2.2.3.1 操作步骤

1）用裂解缓冲液混悬清洗过的细胞。通常细胞湿重（g）与缓冲液体积（ml）之比的范围是 1/1 到 1/4；

2）加样品液进入高压室，并提升压力至预定值（一般 $0.55\times10^8\sim1.38\times10^8$ Pa；

3）维持上述压力，调整出口流速为每分钟 2～3ml（约每秒 1 滴）。

2.2.3.2 注　意

1）该法常用来裂解细菌和酵母[1,33]。

2）适用于中等体积（10～30ml）的样品，体积太大或太小均不适宜。

3）为获得样品最佳破碎效果，样品可以第二次甚至第三次通过高压匀浆。

4）温度敏感物质有必要低温操作。多次实施时，每次样品要冷却。

2.2.4 研　　磨

研磨是破碎单一细胞的有效措施。借助研磨中磨料和细胞间的剪切及碰撞作用破碎细胞。常用的磨料为沙子、氧化铝[8,34]。在研钵内样品与磨料被研磨成厚糊状。一次破碎的细胞量湿重可达 30g。

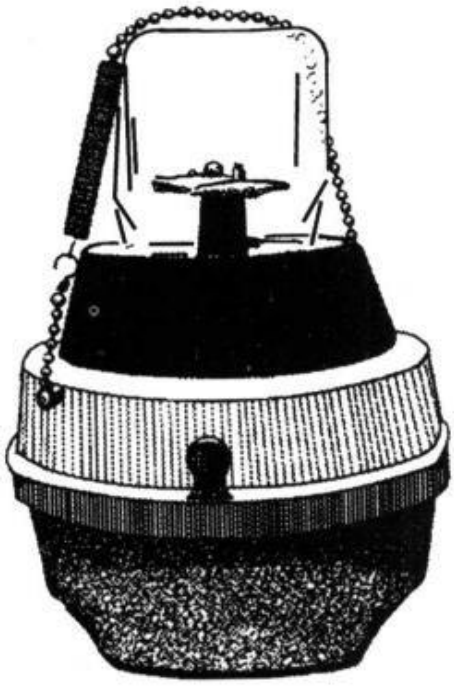


图 2.4　高速珠磨匀浆器

2.2.4.1 操作步骤

1）加 20g 清洗过的细胞入预冷的研钵内；

2）准备 40g 石英沙或氧化铝；

3）在研磨细胞的过程中逐步加入石英沙或氧化铝，即边研磨边加入。加完磨料再继续研磨几分钟；

4）用 60ml 缓冲液混悬细胞糊，离心除去细胞碎片和磨料。

2.2.4.2 注　　意

1）此法主要用于细菌、酵母和一些植物组织。研磨操作一般不超过 15min。

2）石英沙或氧化铝用前做清洁处理。

3）研磨时产生劈啪声可能是效果不错的好兆头。

2.2.5 （高速）珠磨

该法应视为研磨法的扩展。它用玻璃珠替代磨料。小量样品（湿重不超过3g）可在试管内进行，大量样品需使用特制的高速珠磨机。

2.2.5.1 操作步骤

1）0.1～3g湿重细胞混悬在等体积缓冲液内。容器建议选用结实的聚乙烯试管；
2）每克湿重细胞加入1～3g预冷的玻璃珠；
3）用混旋搅拌器最大强度混旋3～5次，每次1min，两次之间置冰上冷却1min。

2.2.5.2 注　　意

1）本法最常用来破碎酵母[31]。
2）玻璃珠直径500μm，用前如下处理：浓盐酸洗后，双蒸水洗至中性，烘干。用前预冷。
3）混旋时易漏出，宜用有密封圈的螺旋盖关紧试管或用石蜡膜封好。

2.2.6 酶　　溶

酶溶法就是用生物酶将细胞壁和细胞膜消化溶解的方法。因此利用此方法处理细胞必须根据细胞的结构和化学组成选择适当的酶。常用的有溶菌酶、β-1，3-葡聚糖酶、β-1，6-葡聚糖酶、蛋白酶、甘露糖酶、糖苷酶、肽链内切酶、壳多糖酶等。细菌主要用溶菌酶处理，酵母需用几种酶进行复合处理。使用溶酶系统时要注意控制温度、酸碱度、酶用量、先后次序及时间。这里仅以溶菌酶处理大肠杆菌为例，介绍具体方法如下。

2.2.6.1 操作步骤

1）混悬洗过的大肠杆菌于 TE 缓冲液内，每克细菌需 3ml 缓冲液。调整温度至 20℃～37℃；
2）每 5ml 混悬液加入 1mg 溶菌酶，可以从新配制10mg/ml 的母液吸取或直接用酶的冻干粉；
3）在 20℃～37℃温育 10～20min，同时轻轻摇动。

2.2.6.2 注　　意

1）增加溶菌酶的浓度，如高达 10mg/ml，能更快的溶解细菌，用更高的浓度甚至在 4℃作用 5min 即可获得满意的溶解。
2）虽然酶溶法有选择性释放产物、核酸泄出量少、细胞外形完整等优点，但它也存在明显不足；如酶价格高、通用性差、有时存在产物抑制。
3）酵母细胞酶溶法较复杂，其操作步骤可查阅文献 [12，16]。

2.2.7 化学渗透

有些有机溶剂（如苯、甲苯）[6,36]、抗生素、表面活性剂(SDS、Triton X-100)、金属螯合剂（EDTA)、变性剂（盐酸胍、脲）等化学药品都可以改变细胞壁或膜的通透性，使内含物有选择地渗透出来。这种处理方式就是化学渗透法。本文仅以表面活性剂 Triton X-100 为例简要介绍如下。

2.2.7.1 操作步骤

1）用缓冲盐液（TBS：10mmol/L pH7.5 Tris-HCl，150mmol/L NaCl）4℃洗细胞几次；
2）离心除去缓冲盐液，在含 0.1%～0.3% Triton X-100 的缓冲盐液（TBS）中混悬细胞（10^7～10^8 细胞/ml 或总

蛋白 3～4mg/ml)；

3）混旋或颠倒试管几次后，冰浴中孵育 10～60min。

2.2.7.2 注　　意

1）低浓度表面活性剂处理，如能充分溶解细胞，则它是很温和的方法。

2）若目的蛋白不稳定，冰浴中孵育时间可以减少甚至取消；裂解液内加入 0.2 倍体积 50% 甘油也可以稳定目的蛋白。

3）Triton X-100 以外的表面活性剂也可以用。

4）此法主要用于溶解培养的动物细胞[10,18]。

2.2.8 其他方法

其他较常见的还有低渗裂解法、冻融裂解法等。低渗裂解法是无胞壁细胞在低渗溶液中通过渗透张力作用裂解的方法，常用于红细胞的裂解。冻融裂解法是反复冻融几次裂解细胞的方法，它仅适用于提取非常稳定的蛋白。对于韧性很强的组织如皮肤、肌腱等，可用液氮冻硬变脆，敲碎成小块后，在研钵中加液氮研成粉再加缓冲液溶解。上述方法的细节就不再赘述了，如感兴趣可查阅其他参考书及文献。

2.3 包涵体蛋白质的溶解

采用分子生物学技术导入的外源基因在细菌中获得外源蛋白的高效表达，常常造成相当多的蛋白质产物在细菌内凝集为没有活性的固体颗粒，即包涵体[14,19,25]。包涵体基本由蛋白质构成，其中 50% 以上是克隆产物，这些产物的一级结构是完全正确的，但是立体构型却存在错误，所以没有生物学活性。天然细菌蛋白很高水平表达时也有凝集的倾向，尤其是单个氨基酸残基突变的天然蛋白也可能形成包涵体[20]。溶解包涵体，使其中的蛋白产物恢复活性是相当困难的。这就促使科学家一方面探讨在表达中

避免蛋白产物包涵体的形成；另一方面研究从包涵体分离出有活性的蛋白产物。分离纯化细菌包涵体蛋白的基本步骤如下：破碎细胞→分离包涵体→溶解包涵体→蛋白质产物的构型复原等。

2.3.1 包涵体蛋白质的溶解及复性

包涵体形成的原因比较复杂，至今尚不完全清楚。研究表明它的形成并非由于表达蛋白浓度超过溶解度造成的，链内二硫键的错配也不是它形成的主要原因[17,27,30]。优势的观点认为：表达的外源蛋白缺少某些协助因子或因为局部微环境不适宜，不能正确地连续地形成次级键，经过多个中间折叠体最终形成天然三维结构。包涵体很可能就是表达蛋白不适当的中间折叠体高浓度积聚在一起形成的不溶物。它们不能进一步完成正确折叠成为天然结构，而是表达蛋白非天然形式的混合物[11,20,27]。包涵体有时在相差显微镜下可以直接观察到，位于大肠杆菌两端，呈深色的折光点，约 0.5～1μm。电镜易于观察和鉴定。

虽然包涵体是表达蛋白非天然形式的混合物，但是其肽链本身是完整的，或者说一级结构是正确的。从包涵体纯化表达蛋白的一个优点是包涵体易于与细胞其他成分分离[25]。一般的水溶液很难溶解包涵体，只有在变性剂（如盐酸胍、脲）溶液中才能很好溶解。这时，溶解的包涵体蛋白获得完全变性，即除一级结构和共价键保留外，所有的氢键、疏水键全被破坏，疏水侧链完全暴露。然后，在一定条件下除去变性剂促使产物蛋白完成正确的蛋白折叠过程，获得天然结构，该过程称为复性。蛋白质复性是十分复杂的过程，目前采用的方法主要有两种。一种是稀释溶液，使溶液中变性剂浓度逐步降低，蛋白质开始复性。此法简单易行，但操作的液量体积有时过大，同时也降低了蛋白质的浓度。另一种是透析、超滤或电渗析除去变性剂。透析法经常用于实验室，溶液对水或缓冲液透析，变性剂透过膜扩散浓度逐渐降低，蛋白质获得复性。该法液量总体积和蛋白质浓度变动不大，但时间较长，有时会形成蛋白质沉淀。

在复性过程中必须注意的问题是：包涵体蛋白如含有两个以上二硫键时，有可能产生肽链内和肽链间的错配。这种情况，在复性之初需用还原剂（二硫苏糖醇、β-巯基乙醇、还原型谷胱甘肽等）打开二硫键，复性过程中用氧化剂（谷胱甘肽、半胱氨酸、碱性条件下的空气等）促进正确二硫键的形成。

由于蛋白质复性十分复杂，通常包涵体蛋白复性率很低，不超过 20%。应该看到不同的产物蛋白具有不同的结构和功能，其复性过程也各不相同，存在明显的差别和不同难易程度。具体的产物蛋白复性方法要根据基本原理和初步试验，设计及筛选最佳复性方案。迄今包涵体蛋白复性方法的改进仍在不断研究之中。本文主要介绍实验室常用的基本步骤。

2.3.1.1 包涵体检定

首先要检查总细胞抽提物中是否存在产物蛋白的高水平表达；其次要检查高水平表达的产物蛋白是否主要以不可溶的形式存在；最后要确定是否产物蛋白积聚形成包涵体。常采用的方法有电泳、免疫印迹、相差显微镜或电镜观察（图 2.5）等。

2.3.1.2 细胞裂解

1）选择裂解细胞的工作缓冲液，实验室常见的通用缓冲液是：0.05mol/L，pH7.0 磷酸盐缓冲液，含 0.05mol/L 氯化钠和 1mmol/L EDTA。在适量缓冲液内混悬细胞。

2）选用超声、玻璃珠研磨或溶菌酶处理等方法裂解细胞（参照 2.2）。建议此步骤适当加入蛋白酶抑制剂。

2.3.1.3 包涵体分离

1）离心细胞裂解液，12 000×g 4℃，5min。

2）将沉淀混悬在 9 倍体积含 0.5% Triton X-100 的工作缓冲液内。室温孵育 5min。

3）再次离心，12 000×g 4℃，5min。

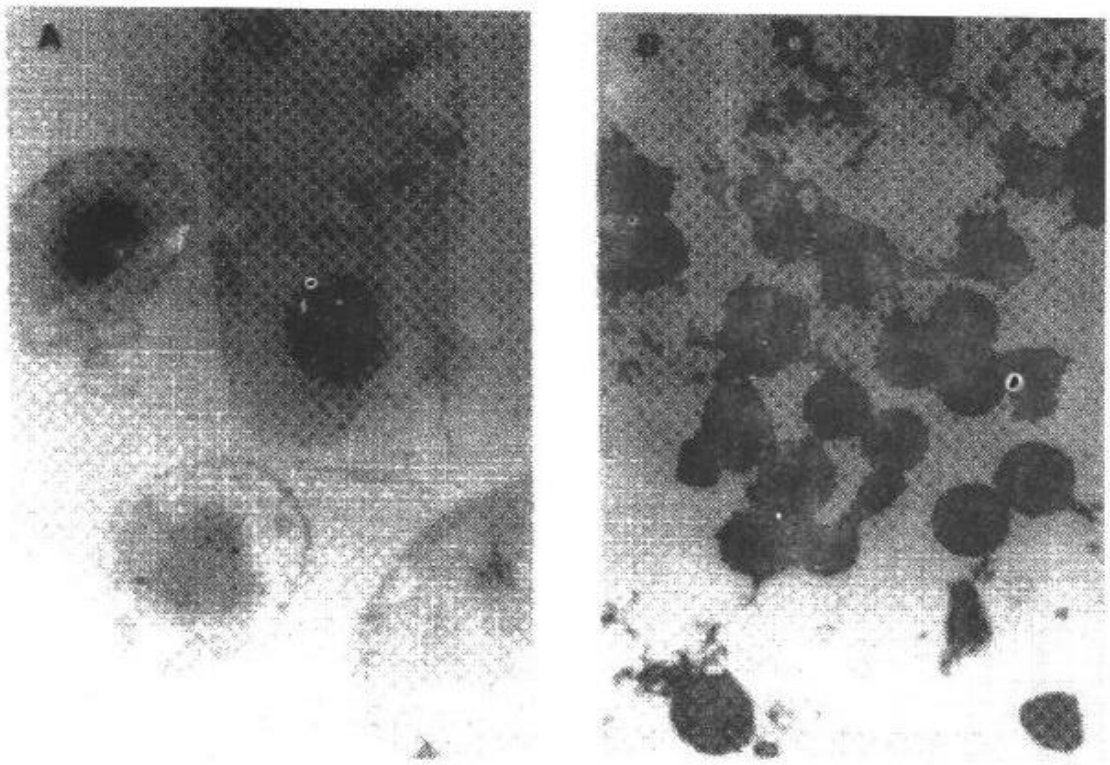


图 2.5　包涵体的电镜观察。(A) 大肠杆菌的超薄切片显示突变的 CheB 蛋白的包涵体。包埋的菌体未被染色。(B) 电镜下观察到的含 CheB 蛋白的包涵体的大肠杆菌匀浆，菌体及其碎片未被染色（引自文献 [20]）

2.3.1.4　包涵体溶解

1）每克沉淀在 9ml 含 8mol/L 脲、2mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.2mmol/L 氧化型谷胱甘肽的工作缓冲液内混悬。请注意此时蛋白浓度应不超过 2.5mg/ml，浓度过高不利于天然结构的形成。

2）将溶液在室温保留 60min。

2.3.1.5　复　　性

1）每毫升脲-蛋白溶解液缓慢加入 9ml 含 2mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.2mmol/L 氧化型谷胱甘肽工作缓冲液。

2）室温孵育 2～4h。

2.3.1.6 注　　意

1）一定要检测裂解液上清中的可溶产物蛋白。有时尽管形成包涵体，仍有一定量的可溶性产物蛋白。

2）为监测细胞裂解的程度，裂解后应用相差显微镜进行检查。如有完整细胞将会随包涵体沉淀，从而降低包涵体蛋白的纯度，则需要进一步裂解。

3）常用6mol/L盐酸胍替代8mol/L脲溶解包涵体。偶而，也用1%SDS溶解包涵体，但在后面的步骤里较难除去。

4）复性过程中，二硫键的变换也可以在碱性条件（pH 10.7）溶解蛋白，然后用盐酸滴定至pH 8.0的方法[26]，而不用谷胱甘肽等还原剂、氧化剂等。

5）复性也可以通过加入伴侣分子、配体、底物或辅基等获得较理想的结果。它们可能促进与天然结构密切相关的折叠中间体的稳定。

6）不同的包涵体蛋白有不同的最佳复性途径[15,20,26,35]。有时侧链化学修饰或加入蛋白沉淀剂也能帮助完成复性[15,22]。

2.3.2　防止包涵体形成

细菌表达蛋白积聚在包涵体内很少是100%，常见情况是表达蛋白存在一定程度的分离，即一部分表现为可溶性天然蛋白；一部分表现为包涵体变性蛋白。目前的理论认为包涵体主要由于未完成折叠的多肽链积聚形成，所以减少包涵体形成，增加可溶性蛋白表达的策略之一是改变折叠中间体形成的速率，从而降低折叠中间体之间的相互作用，加快正确折叠形成天然结构的速率。已有一些文献[14]介绍增加细菌表达可溶性蛋白的方法，遗憾的是没有一个通用的模式。为特定蛋白寻找最佳方法，不得不依照基本原理去试验一些方案，筛选出切实可行的。

（1）降低细胞生长温度

正在折叠的中间体聚集主要是通过疏水表面相互作用而产生。在较低温度下疏水表面的相互作用减弱，所以降低培养液温度有可能减少折叠中间体彼此结合的速率，提供更多的时间正确折叠形成可溶性天然的空间结构。在大肠杆菌表达重组人干扰素时，降低培养温度到30℃表达的产物蛋白可达到37℃表达的3～16倍[32]。但是此方法使用是有限度的，因为有效的细胞生长温度范围十分狭窄。

（2）共表达分子伴侣

分子伴侣是一些蛋白质，它们可以利用水解ATP释放的能量维持一些折叠蛋白在溶解状态。原核分子伴侣（GroEL、GroES、DnaK、HtpG）和真核分子伴侣是同源分子，它们也能稳定原核细胞中表达的真核蛋白的折叠中间体。例如共表达分子伴侣DnaK使大肠杆菌中表达的可溶性人生长激素高达87%[5]。Amrein等[2]共表达GroEL、GroES和目的蛋白也获得满意的结果。应该注意到：大多数情况即使共表达分子伴侣也难以获得高效表达的可溶性产物蛋白。

（3）改变渗透压

Blackwell和Horgan[4]在大肠杆菌中表达农用菌5′-AMP转移酶时，观察到标准条件下90%以上的细胞形成包涵体，但是存在山梨醇和甘氨酰甜菜碱时该酶几乎以完全可溶的形式表达其机理可能是山梨醇促进细胞摄取甘氨酰甜菜碱，后者通过优先水合作用稳定蛋白结构[3]。总之，某些情况下改变渗透压会影响包涵体的形成，也许会提高可溶性蛋白的表达水平。

（4）融合蛋白

La Vallie[21]等将硫氧还蛋白基因和多种哺乳类细胞因子或生长因子基因进行融合表达，在原核细胞中成功地获得了高水平可溶性表达。提示目的蛋白基因与特定的基因融合表达可能会减少包涵体的形成。

参考文献

[1] Adair, L. B. and M. E. Jones. 1978. Aspartae Carbamyltransferase (Pseu-

domonas Fluorescens). Meth. Enzymol., 51: 54~58.

[2] Amrein, K. E., B. Takacs, M. Steiger, J. Molnos, N. A. Flint and P. Burn. 1995. Purification and Characterization of Recombinant Human p50^{csk} Protein-tyyosine Kinase from an Escherichia coli Expression System Overproducing the Bacterial Chaperones GroES and GroEL. Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 1048~1052.

[3] Arakawa, T. and S. N. Timasheff. 1985. The Stabilization of Proteins by Osmolytes. Biophys. J., 47: 411~414.

[4] Blackwell, J. R. and R. Horgan. 1991. A Novel Strategy for Production of a Highly Expressed Recombinant Protein in an Active Form. FEBS Lett, 295: 10~12.

[5] Blum, P., M. Velligan, N. Lin and A. Matin. 1992. DanK-mediated Alternations in Human Growth Hormone Protein Inclusion Bodies. Bio. Technology, 10: 301~304.

[6] Ehrlich, H. A., Cohen, S. N. and McDevitt, H. O. 1979. Immunological Detection and Characterization of Products Translated from Cloned DNA Fragments. Meth. Enzymol., 68: 443~453.

[7] Enquist, L. and N. Sternberg. 1979. Meth. Enzymol. In vitro packaging of λ Dam vectors and their use in cloning DNA fragments. Meth. Enzymol., 68: 281~298.

[8] Fahnestock, S. R. 1979. Reinstitution of Active 50S ribosomal subunits from bacillus lichenformis and bacillus subtilis. Meth. Enzymol., 59: 437~443.

[9] Fleischer, S., J. O. McIntyre and J. C. Vital. 1979. Large-scale preparation of rat liver mitochondria in high yield. Meth. Enzymol., 55: 32~39.

[10] Fong, S. L., Tsin, A. T. C., Bridges, C. D. B. and Liou, G. I. 1982. Detergents for extraction of visual pigments: types, solubilization, and stability. Meth. Enzymol., 81: 133~140.

[11] Haase-Pettingell, C. and J. King. J. 1988. Formation of aggregates from a thermolabile in vivo folding intermediate in P22 tailspike maturation: a model for inclusion body formation. Biol. Chem., 263: 4977~4983.

[12] Harlow, E. And D. Lane. Antibodies: A Laboratory Manual. 726 pages. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

[13] Hochstadt, J. 1978. Adenosinephosphoribosyltransferase from *E. coli*. Meth. Enzymol., 51: 558~567.

[14] Hockney, R. C. 1995. Recent developments in heterologous protein production in *E. coli*. Trends Biotech., 13: 456~463.

[15] Hofmann, A., M. Tai, W. Wong and C. G. Glabe. 1995. A sparse matrix screen to establish initial conditions for protein renaturation. Anal. Biochem., 230:

8 - 15.

[16] Jazwinski, S. M. 1990. Preparation of extracts from yeast Meth. Enzymol., 182: 154 - 174.

[17] Kane, J. F. and D. L. Hartley. 1988. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *E. coli*. Trends Biotech., 6: 95 - 101.

[18] Kreibich, G. and Sabatini, D. D. 1974. Procedure for the selective release of content from microsomal vesicles without membrane disassembly. Meth. Enzymol., 31: 215 - 225.

[19] Krueger, J. K., M. H. Kulke, C. Schutt and J. Stock. BioPharm. 1989. Protein inclusion body formation and purification. Manufacturing, 3: 40 - 45.

[20] Krueger, J. K., A. M. Stock, C. E. Schutt and J. B. Stock. 1990. In L. M. Gierasch and J. King eds. Protein folding: Deciphering the second half of the genetic code. American association for the advancement of science. Washington, D. C., 136 - 142.

[21] LaVallie, E. R., E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel and J. M. McCoy. 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. Bio/Technology, 11: 187 - 193.

[22] Light, A. 1985. Protein solubility, Protein modifications and protein folding. Biotechniques, 3: 298 - 306.

[23] 刘国诠 主编. 1993. 生物工程下游技术——细胞培养、分离纯化、分析检测. 北京：化学工业出版社，65 - 90.

[24] Lu, A. Y. H and W. Levin. 1978. Purification and assay of liver microsomal epoxide hydrase. Meth. Enzymol, 52: 195 - 200.

[25] Maston, A. O. 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E. coli*. Biochem. J, 240: 1 - 12.

[26] Maston, A. O., P. A. Lowe, M. T. Doel, J. M. Schoemaker, S. White and S. Angal. 1984. Purification of calf prochymosin (procreunin) synthesized in *Escherichia coli*. Bio/Technology, 2: 800 - 804.

[27] Muraki, A. and J. King. 1989. Protein folding intermediates and inclusion body formation. Bio/Technology, 7: 690 - 697.

[28] Novessary, P. C., B. Roberts, P. A. Humphrey, G. M. Helmkamp, Jr. C. D. Turner, A. B. Rawitch and K. E. Ebner. 1985. The cuisinart food processor efficiently disaggregates tissues. Anal. Biochem., 146: 372 - 373.

[29] Pederson, P. L. and J. Hullihen. 1979. Resolution and reconstitution of ATP synthesis and ATP-dependent functions of liver mitochondria. Meth. Enzymol.,

55：736～741.

[30] Pigiet, V. P. and B. J. Schuster. 1986. Thioredoxin-catalyzed refolding of disulphidecontaining proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83：7643～7647.

[31] Schatz, G. 1979. Biogenesis of yeast mitochondria：Synthesis of cytochrome c oxidase and cytochrome c1. Meth. Enzymol., 56：40～50.

[32] Schein, C. H. and M. H. M. Noteborn. 1988. Formation of soluble recombinant proteins in *E. coli* is favored by lower growth temperature. Bio/Technology, 6：291～294.

[33] Schramm, V. L. and H. B. Leung. 1978. Adenine monophosphate nucleosidase from Azotobacter vinelandii and *E. coli*. Meth. Enzymol., 51：263～271.

[34] Schald, W. W. Neupert and H. Weiss. 1979. Preparation of neurospora crassa mitochondria. Meth. Enzymol., 55：144～148.

[35] Van Kimmenade, A., M. W. Bond, J. H. Schumacher, C. Laquoi and R. A Kastelein. 1988. Expression, renaturation and purification of recombinant human interleukin 4 from *E. coli*. Eur. J. Biochem., 173：109～114.

[36] Young, R. A. and R W. Davis. 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80：1194～1198.

柳 川

第三章　蛋白质浓度测定

3.1　280 纳米(A_{280})光吸收法

这一方法可用来快速检测溶液中是否含有蛋白质成分。通常用于柱层析过程中检测蛋白质的洗脱峰。

3.1.1　提　　要

3.1.1.1　所需时间

几分钟。

3.1.1.2　优　　点

1）快速；

2）对蛋白质无破坏性。

3.1.1.3　缺　　点

1）不是严格的定量，因为此法是根据酪氨酸（Tyr）、苯丙氨酸（Phe）和色氨酸（Trp）残基的强吸收值来测定的。不同的蛋白质具有不同的消光系数，如果一种蛋白质中没有 Phe、Tyr 或 Trp 残基，用此方法就不能检出，但对于粗提蛋白成分的混合物来说，此法合适。

2）核酸可引起强干扰作用。

3.1.1.4　灵　敏　度

0.2mg/ml ~ 2mg/ml；比色杯的最小测量体积为 0.1ml（~0.05mg）。

3.1.1.5 原　　理[3]

由于蛋白质分子中常含酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等苯环结构，在紫外 280nm 波长处有最大吸收峰，其吸收值与蛋白质浓度成正比，故可用 280nm 波长吸收值大小来测定蛋白质含量。

3.1.2 设　　备

1）分光光度计（配备紫外档）
2）石英比色杯
3）用于溶液转移的吸管和吸球

3.1.3 试　　剂

实验用缓冲液（空白对照）

3.1.4 操作步骤

3.1.4.1 单道分光光度计

1）将实验用缓冲液加入比色杯中，将 A_{280} 值调至零。
2）吸去缓冲液对照加入样品，记录 A_{280} 值。

3.1.4.2 双道分光光度计

1）将仪器调零。
2）将样品和对照分别加入样品杯和对照杯中，然后记录光吸收值。

3.1.5 注意事项

1）实验室中常犯的错误是认为用 1cm 的比色杯所测光吸收值为 1.0 时，蛋白质溶液浓度大约为 1mg/ml，这是非常不精确的。以下比较了不同的标准蛋白质在1mg/ml时的光吸收值[4]。

2）这一技术被广泛用在柱层析时监测蛋白质洗脱峰的出现，但是除非使用更特异的方法，A_{280}值并不能代表洗脱蛋白质的量，可使用快速和灵敏的蛋白质定量方法如 Bradford 或蛋白质点杂交结合测定法。

蛋白质	A_{280}	蛋白质	A_{280}
牛血清白蛋白	0.70	γ 球蛋白	1.38
核糖核酸酶 A	0.77	胰蛋白酶	1.60
卵白蛋白	0.79	胰凝乳蛋白酶	2.02
肠击素	1.33	α 淀粉酶	2.42

3）玻璃和塑料在紫外吸收光范围内具有光吸收值，因而不能用来进行蛋白质的定量。

4）如果所测值超过测量范围，应将样品用缓冲液稀释后再测量，或使用更小的比色杯来测量。

5）如果实验所用的缓冲液和水相比有较高的光吸收值，这说明缓冲液中有干扰物质存在（见干扰物质表）。适度的缓冲液的光吸收值可通过调零来平衡，但是由于干扰物质的偏离光影响在高的光吸收值下，分光光度计的灵敏度范围变窄。可见附录 4 说明如何检测分光光度计光吸收值的线性范围。

6）修改测定方法可部分改正由于干扰物质和蛋白质组成不同所引起的误差，其中包括检测 A_{280}/A_{260}的比值[2] 和 A_{280}/A_{235}的比值。

7）当有核酸存在时，可进行如下修正[1]：

蛋白质浓度（mg/ml）$=1.5\times A_{280}-0.75\times A_{260}$。

8）在列线图（图 3.1）中显示了这一方法的测量情况。如果 A_{280}/A_{260}值约为 2，这时可忽略溶液中核酸的光吸收值。

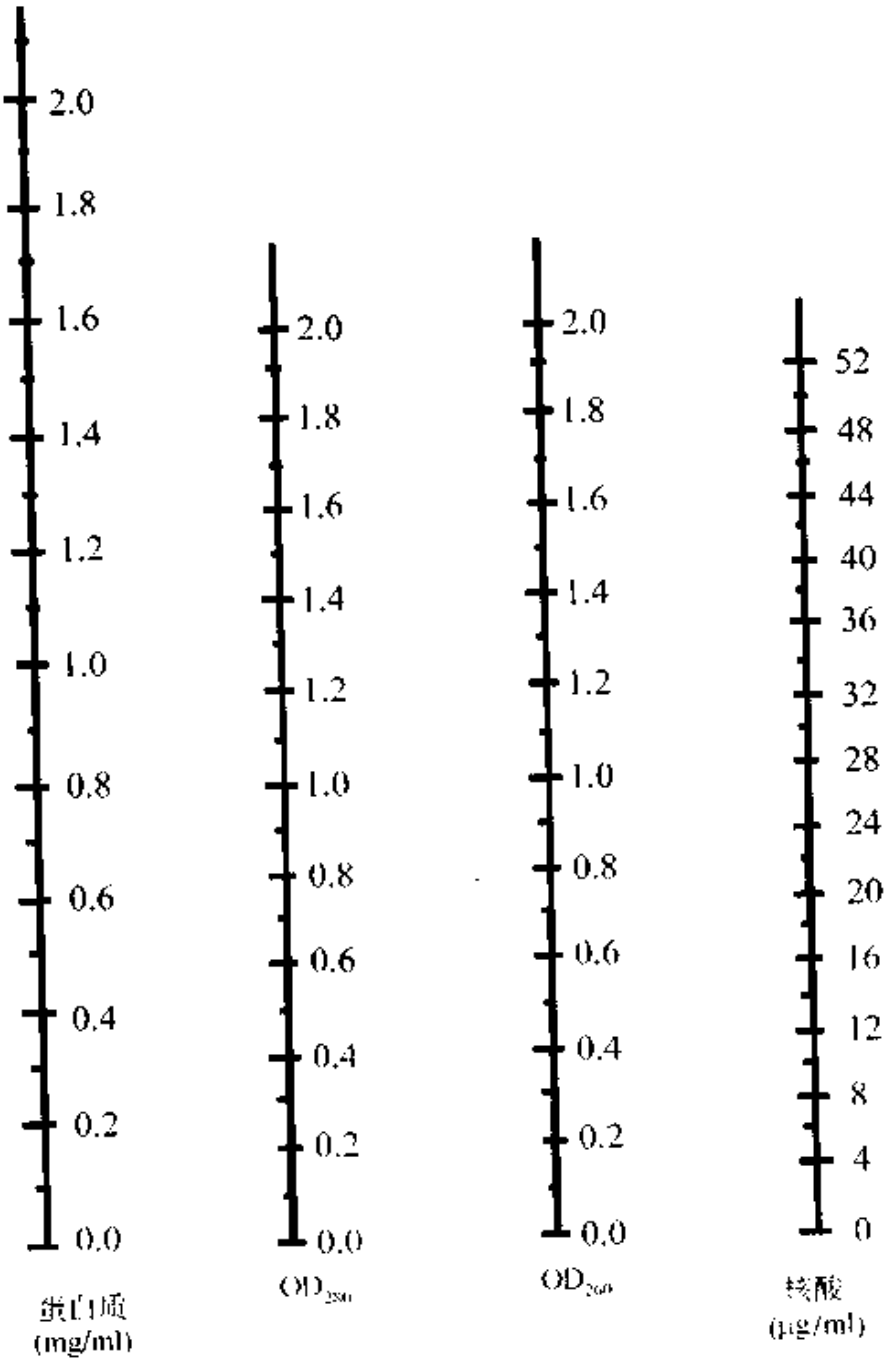


图 3.1　列线图。在中间 280nm 和 260nm 两条标尺上相应两点的光密度值连线向两侧延伸分别与左右两直线相交，从两个交点可推测出相应的蛋白质和核酸的浓度

3.2 Bradford 检测法

这是一种迅速、可靠的通过染色法测定溶液中蛋白质的方法。尽管相对来说此法的干扰物质较少，但因染料与不同的纯化蛋白质的相互作用有强有弱，因此这也不是一种严格的定量方法。Bio-Rad 公司的蛋白质定量检测试剂盒即以此法为依据的。

3.2.1 提　　要

3.2.1.1 所需时间

10min。

3.2.1.2 优　　点

1）快速（反应时间仅需 2min）；

2）敏感，几乎没有蛋白质损失。

3.2.1.3 缺　　点

1）对各种纯化蛋白质反应不同；

2）用这种测定方法对蛋白质引起不可逆的变性。

3.2.1.4 灵敏度范围

蛋白质溶液 25μg/ml ~ 200μg/ml，最小测量体积 0.1ml，最小测量蛋白量 2.5μg。

3.2.1.5 原　　理[8]

这一方法基于考马斯亮蓝 G-250 有红、蓝两种不同颜色的形式。在一定浓度的乙醇及酸性条件下，可配成淡红色的溶液，当与蛋白质结合后，产生蓝色化合物，反应迅速而稳定。反应化合物在 465 ~ 595nm 处有最大的光吸收值，化合物颜色的深浅与蛋白浓度的高低成正比关系，因此可检测 595nm 的光吸收值的大小计算蛋白的含量。

3.2.2 设　　备

1）分光光度计
2）塑料比色杯（聚苯乙烯）
3）加样头和加样枪
4）移液管
5）小试管和 Eppendorf 管
6）试管架
7）震荡器

3.2.3 试　　剂

1）考马斯亮蓝 G-250 染料
2）1mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）
3）95%乙醇
4）85%磷酸

3.2.4 操作步骤

3.2.4.1 溶　　液

1）Bradford 储存液
100ml 95%乙醇
200ml 88%磷酸
350mg Serva G 蓝
室温下长期保持稳定。

2）Bradford 工作液
425ml 双蒸水
15ml 95%乙醇
30ml 88%磷酸
30ml Bradford 贮存液
Whatman 1 号滤纸过滤，保存于室温棕色瓶中，可使用数周，但在使用前需要再过滤。

Bio-Rad 公司有商品化的试剂出售。

3.2.4.2 检　　测

1）将蛋白质溶液转移至试管中（最大体积 100μl）；
2）补加实验用缓冲液至终体积 100μl；
3）加入 1ml Bradford 工作液并震荡混匀；
4）在 2min 后测 A_{595}值[13]，测量应在 1h 内完成[6]。

3.2.4.3 制作标准曲线

1）做标准曲线所用的已知蛋白质应和未知浓度蛋白质溶液一起准备，这对于定量测定蛋白质浓度是十分必要的。另外，每一样品应当做两到三次重复，如果用同一个比色杯来测定蛋白质的浓度，则应当先测量低蛋白浓度的样品，以避免因 Bradford 染料吸附在比色杯上不能彻底冲洗干净而带来误差。
2）由于蛋白质和染料形成复合物的反应是连续进行的，Bradford 工作液应当依次加入标准和未知蛋白质溶液中，所有的样品也应按照颜色反应的次序依次测定。每一次测定未知蛋白质溶液的浓度时都应当作一条新的标准曲线。
3）下面的标准曲线数据表列举了如何做标准曲线的过程。在所测蛋白浓度范围内必须确保标准曲线的线性范围内，否则未知蛋白浓度的读数将会出现大的误差。
4）在测出 A_{595}值后，要用所测值的平均值作出图 3.2 中的标准曲线。
5）Bradford 法所测定的标准曲线在 2.5μg～15μg BSA 浓度范围内保持线性关系，如果未知蛋白样品的光吸收值落在标准曲线的范围之外，则所测值的误差范围将相当大。在标准曲线线性范围中的点比在线性范围边缘的点的线性程度更好，它所对应的 X 轴的 BSA 的浓度既为所测蛋白溶液的浓度。

标准曲线

样品号	蛋白量 /μg	标准溶液（1mg/ml BSA）/μl	实验缓冲液 /μl	Bradford 试剂/ml	A_{595}
1	0	0	100	1	0.000
2	2.5	2.5	97.5	1	0.120
3	2.5	2.5	97.5	1	0.130
4	5	5	95	1	0.250
5	5	5	95	1	0.215
6	7.5	7.5	92.5	1	0.331
7	7.5	7.5	92.5	1	0.364
8	10	10	90	1	0.460
9	10	10	90	1	0.442
10	12.5	12.5	87.5	1	0.531
11	12.5	12.5	87.5	1	0.562
12	15	15	85	1	0.633
13	15	15	85	1	0.617
14	17.5	17.5	82.5	1	0.684
15	17.5	17.5	82.5	1	0.650
16	20	20	80	1	0.721
17	20	20	80	1	0.727

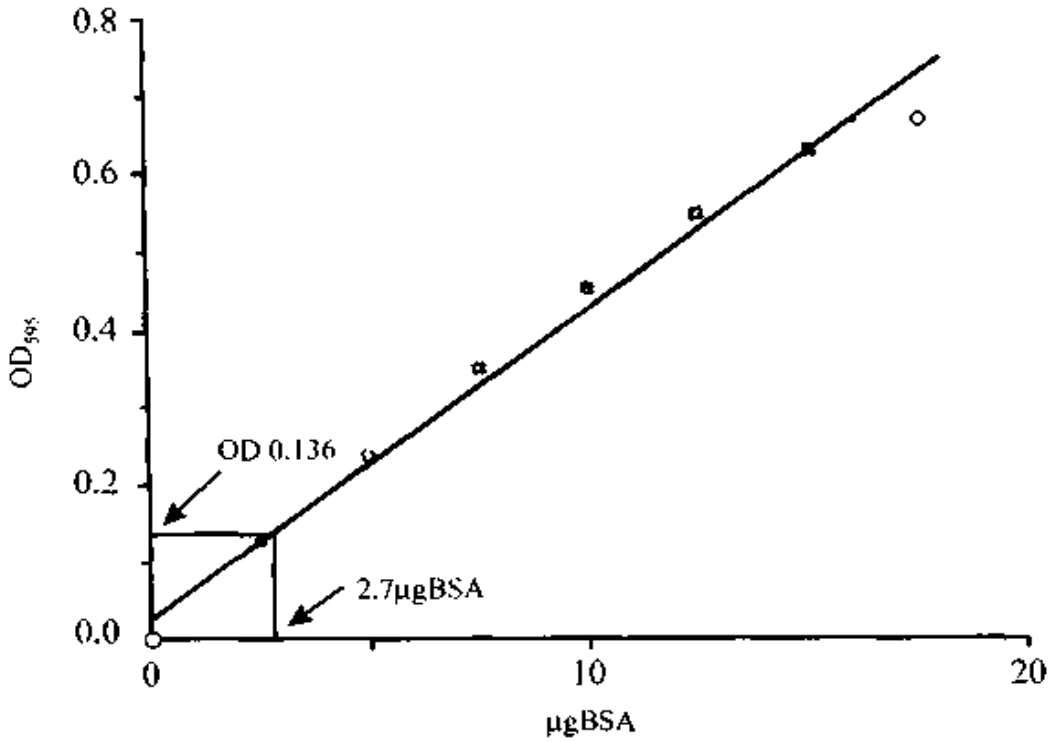


图 3.2　Braford 检测法所测得标准曲线

3.2.4.4 标准曲线的应用

以下为与标准曲线同时测出的样品数值来推测未知蛋白质浓度：

编号	样品/μl	实验缓冲液/μl	Bradford试剂/ml	A_{595}	平均值(A_{595})	蛋白质量/μg	浓度/mg/ml
1	5	95	1	0.059			
2	5	95	1	0.101	0.082		
3	5	95	1	0.085			
4	10	90	1	0.135			
5	10	90	1	0.146	0.136	2.7	0.27
6	10	90	1	0.127			
7	50	50	1	0.700			
8	50	50	1	0.717	0.718	16.4	0.33
9	50	50	1	0.738			

按以下步骤确定蛋白质浓度

1）计算样品的平均光吸收值，如样品4～6，（0.125 + 0.136 + 0.117）/3 = 0.136。

2）使用标准曲线，推断出样品对应的BSA的量（假定与所测蛋白量相当）。如样品4～6，$(OI)_{595}$ = 0.136水平线与标准曲线相交所对应的蛋白量为2.7μg。

3）根据样品各自的体积计算样品的浓度。如样品4～6，2.7μg/10μl = 0.27μg/μl（0.27mg/ml）。

4）低于标准曲线线性范围的平均值应忽略不计。

5）溶液最终的平均浓度为（0.27 + 0.33）/2 = 0.30 mg/ml。

3.2.5 注意事项

1）在反应5min后充分显色，但在10～15min后开始出现沉淀，尤其是高浓度蛋白质溶液在酸性条件下易发生沉淀。

在 10min 之内测完标准品和样品，则颜色损失误差将会小于 2%[11]。

2）推荐使用一次性的塑料比色杯，因为比色杯壁着色后很难洗净。

3）如果用玻璃比色杯，可先用甲醇冲洗，然后用玻璃制品清洁剂洗涤最后用水和丙酮冲洗，或者在浓 HCl 中浸泡过夜[10]。

4）如果样品的光吸收值超过线性范围，可用 Bradford 工作液稀释样品至 5ml 后再测量，空白也进行同样体积的稀释[14]。

5）不同的纯化蛋白质测量结果不同[12,15]，如果用目的蛋白来做标准曲线或用另一种方法来校正，则所测蛋白质浓度较准确。

6）尽管牛血清白蛋白（BSA）和染料的反应并不是很精确，BSA 常被用来做标准曲线，卵白蛋白是另一种可用来做标准曲线的蛋白[13]。

7）放置较久的试剂产生的光吸收值较低[14]。

8）Bradford 方法也可用来检测柱结合蛋白的量[5]。

9）这一方法也可用于膜结合蛋白的检测[9]。

3.3 Lowry 检测法

这一标准、快速的蛋白质定量检测方法已得到广泛应用[16]，在检测之前可通过蛋白质沉淀将干扰物质去除。

3.3.1 提　　要

3.3.1.1 所需时间

40min。

3.3.1.2 优　　点

1）一种可靠的蛋白质定量方法；

2）不同蛋白之间的差别很小。

3.3.1.3 缺　　点

1）干扰物质多；
2）反应速度慢；
3）某些试剂不稳定；
4）使蛋白质发生不可逆变性。

3.3.1.4 灵敏度范围

5μg/ml～100μg/ml

3.3.1.5 原　　理[20]

Lowry法又称为Folin-酚试剂法。首先在碱性溶液中形成铜-蛋白复合物，然后这一复合物还原磷钼酸-磷钨酸试剂（Folin-酚上级），产生钼蓝和钨蓝复合物的深蓝色，这种深蓝色的复合物在745～750nm处有最大的吸收峰，颜色的深浅（吸收值）与蛋白质浓度成正比，可根据750nm的光吸收值大小计算蛋白质的含量。

3.3.2 设　　备

1）分光光度计
2）比色杯
3）移液管
4）枪头和加样枪
5）试管（3～5ml）
6）试管架
7）震荡器

3.3.3 试　　剂

1）$CuSO_4 \cdot 5H_2O$

2）$Na_3C_6H_5O_7$（·$2H_2O$）（柠檬酸）

3）Na_2CO_3

4）NaOH

5）Folin-酚试剂

3.3.4 操作步骤[21]

3.3.4.1 溶　液

（1）溶液 A，100ml

0.5g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

1g $Na_3C_6H_5O_7$（·$2H_2O$）

加双蒸水至 100ml，溶液可长期保存于室温。

（2）溶液 B，1L

20g Na_2CO_3

4g NaOH

加双蒸水至 1L，溶液可长期保存于室温。

（3）溶液 C，51ml

1ml 溶液 A

50ml 溶液 B

（4）溶液 D，20ml

10 ml Folin-酚试剂

10 ml 双蒸水

3.3.4.2 检　测

1）用双蒸水稀释样品至 0.5ml；

2）加 2.5ml 溶液 C；

3）混匀在室温下放置 5～10min；

4）加 0.25ml 溶液 D，混匀；

5）20～30min 后，在分光光度计上测 A_{750}值。

3.3.4.3 从干扰物质中纯化蛋白质样品的附加步骤

脱氧胆酸-三氯醋酸（DOC-TCA）沉淀法。此法可在测定蛋

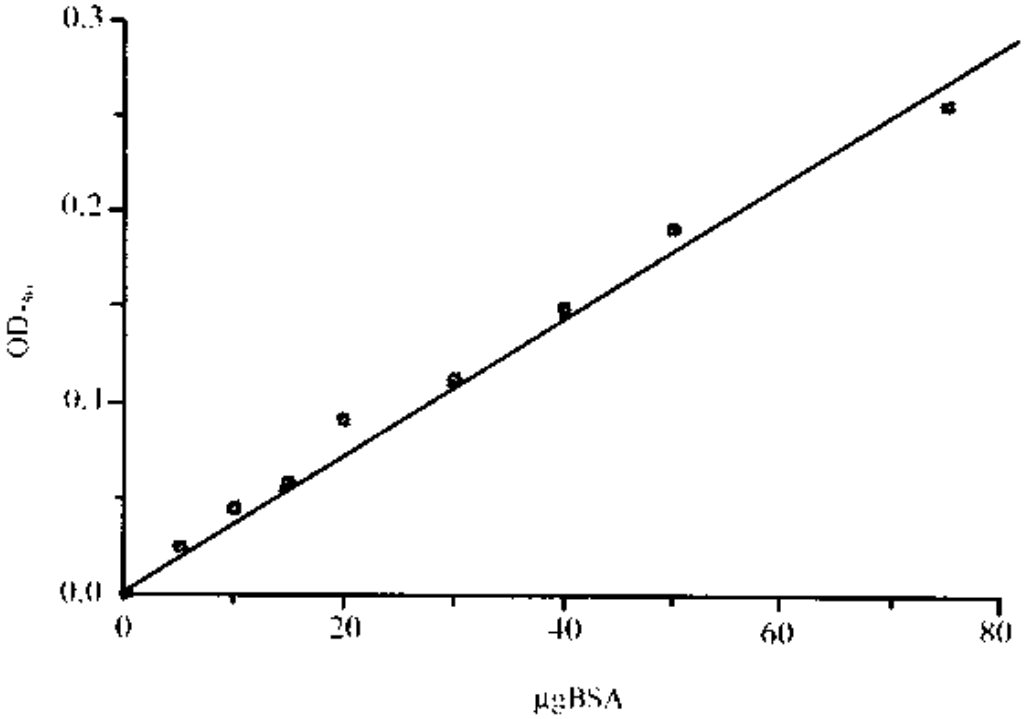


图 3.3　Lowery 检测法标准曲线

白质的溶液浓度低于 **1μg/ml** 情况下使用[20]。

所需试剂：0.15%（w/v）DOC；72% TCA

1）于 1ml 蛋白质样品中加入 0.1ml 0.15% DOC；

2）震荡后在室温放置 10min；

3）加入 0.1ml 72% TCA，摇匀后，1000－3000 × *g* 离心 5－30min，如使用固定角转头，以及低温或大体积则需较长时间离心；

4）倾斜，吸弃上清液；

5）直接用溶液 C 溶解沉淀。

3.3.5　注意事项[18－20]

1）在加入试剂 20－30min 后显色达到饱和，此后每小时颜色信号减弱 1%。

2）许多干扰物质降低颜色反应，而去垢剂引起颜色轻微升高[17]。

3）高浓度盐可引起沉淀。

4）氯仿抽提可去除溶液中的脂质，在 K^+ 或 Triton X-100 存在时可通过离心去除混浊物。

5）去垢剂，蔗糖和 EDTA 的干扰可通过在 Lowry 试剂中加入 SDS 来消除[17]。

6）一般情况下，蛋白质－染料复合物的消光系数≤1.2。

3.4 二喹啉甲酸（BCA）检测法

这是近来新研制的一种改进的 Lowery 测定法，反应简单而且几乎没有干扰物质的影响。

3.4.1 提　　要

3.4.1.1 优　　点

1）单一试剂；

2）终产物稳定；

3）与 Lowry 测定法相比几乎没有干扰物质的影响。

3.4.1.2 缺　　点

1）反应时间长；

2）蛋白质发生不可逆的变性。

3.4.1.3 灵敏度范围

1）标准检测：10～1200μg/ml；

2）微量检测：0.5～10μg/ml。

3.4.1.4 原　　理[27]

在碱性环境下蛋白质分子中的肽键结构能与 Cu^{2+} 络合生成

络合物，同时将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+}。而 BCA 试剂可敏感特异地与 Cu^{+} 结合，形成稳定的有颜色的复合物，在 562nm 处有高的光吸收值。颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，可根据吸收值的大小来计算蛋白质的含量。

3.4.2 设　　备

1）分光光度计
2）37℃ 水浴锅
3）小烧杯
4）移液管
5）枪头和加样枪
6）试管
7）试管架

3.4.3 试　　剂

1）BCA（bicinchoninic acid 二喹啉甲酸）
2）$Na_2CO_3 \cdot H_2O$
3）$Na_2C_4H_4O_6$（$\cdot 2H_2O$）（酒石酸钠）
4）NaOH
5）$NaHCO_3$
6）$CuSO_4 \cdot 5H_2O$

3.4.4 操作步骤[27]

3.4.4.1 溶　　液

（1）试剂 A，1L
10g BCA（1%）
20g $Na_2CO_3 \cdot H_2O$（2%）
1.6g $Na_2C_4H_4O_6$（$\cdot 2H_2O$）（0.16%）
4g NaOH（0.4%）
9.5g $NaHCO_3$（0.95）

加水至 1L，用 NaOH 或固体 $NaHCO_3$ 调节 pH 值至 11.25。

（2）试剂 B，50ml

2g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$（4%）

加双蒸水至 50ml。

试剂 A 和试剂 B 在室温下至少稳定 12 个月，并可购买商品化试剂。

（3）标准工作试剂（SWR）

50 份 试剂 A

1 份 试剂 B

可稳定一周。

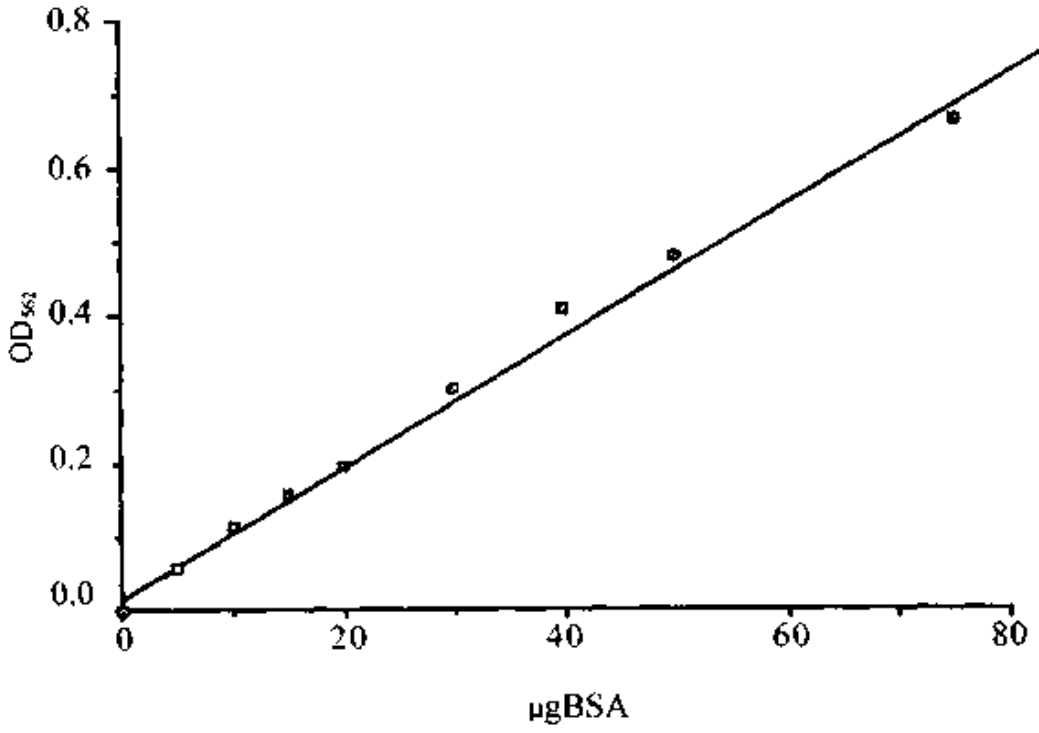


图 3.4 BCA 测定法标准曲线

3.4.4.2 检　　测

1）将 1 倍体积样品与 20 倍体积的 SWR 混合（例如：100μl

样品加入 2ml SWR）；

2）在室温孵育 2h（a）或 37℃ 30min（b）；

3）在（b）情况下冷至室温；

4）在 562nm 读取光密度（OD）值。

3.4.5 注意事项

1）为促进 BCA 法的反应进程，可将实验试管置于微波炉中孵育 20s 以内[22]。

2）在样品冷却至室温后，每 10min 光吸收值升高 2.3%[26]。

3）BCA 法检测微量蛋白灵敏度在 0.5～10μg/ml 时，应采用浓缩试剂，并需要在 60℃ 反应 60min[26]。

4）与 Lowry 法相比，采用 BCA 法时，如果样品中含有脂类物质将明显提高光吸收值[25]。

5）在含巯基试剂和去垢剂的缓冲液中 BCA 呈色发生变化，见参考文献 [23]。

6）蛋白质样品经 DOC-TCA 沉淀（见 3.4 节）后，会去除多数干扰物质。

3.5 斑点滤膜结合法

3.5.1 概　　述

斑点滤膜结合法[28]是一种初步测定蛋白质含量的快速方法。此法尤其适用于密度梯度离心或柱层析中筛选有用的组分。也可用于指示蛋白峰的存在，以减少进一步进行蛋白定量的样品数。

3.5.2 操作步骤

3.5.2.1 材　　料

1）Whatman 3MM 滤纸

2）10%　三氯醋酸（TCA）

3）考马斯亮蓝凝胶染色液

4）考马斯亮蓝凝胶脱色液

3.5.2.2 检　　测

1）用铅笔在 3MM 滤纸上画出 1cm×1cm 大小的方格；
2）在每一方格中心加入 3μl 样品；
3）将滤纸凉干，大约需要 15min；
4）将滤纸浸入 10% TCA 溶液中 30s（TCA 溶液可重复使用）；
5）用水快速漂洗滤纸；
6）将滤纸浸入考马斯亮蓝凝胶染液中 30s（染液可重复使用）；
7）用水快速漂洗滤纸；
8）在考马斯亮蓝凝胶脱色液中使滤纸脱色，脱色在几分钟之内完成；
9）通过相应显蓝色的方格，可判断其含有一定量的蛋白质存在。

3.6 干扰物质表

可接受最高浓度

化合物	A_{280}	Bradford 法	Lowry 法	BCA 法
缓冲液				
乙酸盐	0.1mol/L	0.6 mol/L[12]	–	0.2mol/L[12]
三甲基胂酸盐- Tris	–	0.1 mol/L[9]	–	–
甘氨酸	1 mol/L[12]	0.1 mol/L[1]	2.5mmol/L[5]	1mol/L，Ph11[6]
HEPES	–	100mmol/L[1]	2.5μmol/L[5]	100mmol/L
MES	–	700 mmol/L[1]	25μmol/L[5]	50mmol/L[7]
MOPS	–	200 mmol/L[1]	25μmol/L[5]	50mmol/L[7]
Na^+-柠檬酸	5%[12]	50 mmol/L[1]	2.5mmol/L[5]	<1mmol/L[12]
PIPES	OK	500 mmol/L[1]	5μmol/L[5]	50mmol/L[7]

续表

化合物	A_{280}	Bradford 法	Lowry 法	BCA 法
缓冲液				
磷酸钾	OK	1 mol/L[1]	0.03mol/L[5]	-
磷酸钠	OK	1 mol/L[1]	0.25mol/L[5]	0.1mol/L[6]
乙酸钠	0.1mol/L[12]	0.6 mol/L[13]	-	0.2mol/L，Ph5.5[6]
TES	-	-	1mmol/L[5]	50mmol/L[7]
Tris	0.5mol/L[12]	2 mol/L[1]	250μmoL/L[5]	0.1mol/L[6]
盐类				
硫酸铵	>50%[12]	1 mol/L[1]	28mmol/L[5]	干扰[8]
NaCl	>1 mol/L[12]	1 mol/L[1]	30mmol/L[5]	1mol/L[12]
尿素	>1 mol/L[12]	6mol/L[1]	200mmol/L[5]	3mol/L[6]
去垢剂和变性剂				
Brij35	1%[12]	干扰[2]		1%[6]
CHAPS	10%[12]	1%[1]	1mmol/L[11]	1%[6]
盐酸胍	-	OK[1]	-	4mol/L[8]
脱氧胆酸钠	0.3%[12]	0.25%[1]	0.0625%[5]	-
NP-40	干扰	干扰[2]	-	1%[6]
辛葡糖	10%[12]	2%[2]	干扰[13]	1%[6]
SDS	OK	0.1%[1]	1.25%[5]	1%[6]
胆酸钠	-	干扰[2]	-	-
Triton X-100	0.02%[12]	0.1%[1]	0.25%[5]	1%[6]
Tween-20	0.3%[12]	干扰[2]	-	-
糖类				
葡萄糖	OK	OK[1]	30mmol/L	10mmol/L[6]
蔗糖	2mol/L[12]	1mol/L[12]	10μmol/L	1mol/L[6]
螯合剂				
EDTA	30mmol/L[12]	100mmol/L[1]	125μmol/L	10mmol/L[6]
EGTA	OK	0.05mol/L[3]	干扰	-
还原剂				
2-巯基乙醇	10mmol/L[12]	1mol[1]	1.75mmol/L	50μmol/L[10]
DTT	在氧化状态下干扰	1 mol/L[1]	50μmol/L	1mmol/L[6]
醇类、极性化合物				
丙酮	干扰	OK[1]	1.25%	-

续表

化合物	A_{280}	Bradford 法	Lowry 法	BCA 法
醇类，极性化合物				
DMSO	20%[12]	–	6.2%	5%[12]
乙醇	OK	OK[1]	12.5%	–
1，2-亚乙基二醇	OK	–	0.25%	–
甘油	40%[12]	99%[1]	25%	10%[6]
甲醇	OK	OK[1]	–	–
其他物质				
丙烯酰胺	–	–	1.25mg/ml[5]	–
DNA	干扰	1mg/ml[1]	190μg/ml[5]	–
脂类	–	–	25μmol/L[5]	干扰[9]
$MgCl_2$	OK	1mol/L[1]	–	–
RNA	干扰	0.3mg/ml[1]	–	–
ATP	干扰	1mmol/L[1]	–	–
两性电解质	–	1%[3,4]	干扰[5]	–
中性 TCA	10%[12]	–	12.5mg/ml[5]	–
HCl	>1 mol/L[12]	0.1M[12]	–	0.1N[6]
NaOH	>1 mol/L[12]	0.1M[12]	–	0.1N[6]
NAD	干扰	1mmol/L[1]	–	–
苯	干扰	5%[1]	–	–
氨基酸	芳香族干扰	OK[1]	–	–
多肽<3Kd	干扰	OK[1]	–	–

（–）代表这一化合物没有经过试验检测；“OK”表示这一化合物被成功试验过，但没有给出浓度；注意由于检测方案不同，可允许用量将有所改变。1：Bio-Rad Bulletin 1069，1987；2：Fanger，1987；3：Reader and Northcote，1981；4：Scpector，1978；5：Peterson，1983；6：Pierce Bulletin 23225，1984；7：Kaushal and Barners，1986；8：Smith et al.，1985；9：Kessler and Fanestil，1986；10：Hill and Straka，1988；11：Boehringer Mannheim Catalog；12：Stoscheck，1990；13：Harris，1989。

参考文献

[1] Schleif，R. F. and P. C. Wensink. 1981. Practical Methods in Molecular Biology. New York，Springer-Verlag.

[2] Warburg，O. and W. Christian. 1941. Isolierung und Kristallisation des Gaerungsferments Enolase. Biochem. Z.，310：384～421.

[3] Wetlaufer, D. B. 1962. Ultraviolet Spectra of Proteins and Amino Acids. Adv. Prot. Chem., 17: 303~309

[4] Whitaker, J. R. and P. E. Granum. 1980. An Absolute Method for Protein Determination Based on Difference in Absorbance at 235 and 280nm. Anal. Biochem., 109: 156~159.

[5] Asryants, R. A., I. V. Duszenkova and N. K. Nagradova. 1985. Determination of Sepharose-Bound Protein with Coomassie Brillient Blue G-250. Anal. Biochem, 151: 571~574.

[6] Bearden, J. C. 1978. Quantitation of Submicrogram Quantities of Protein by an Improve Protein-Dye Binding Assay. Biochem. Biophys. Acta, 533: 525~529.

[7] Bio-Rad Protein Assay. 1987. Bio-Rad Technical Bulletin 1069, Bio-Rad Laboratories.

[8] Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem., 72: 248~254.

[9] Fanger, B. O. 1987. Adaptation of the Bradford Protein Binding Assay to Membrane-Bound Proteins by Solubilizing in Glucopyranoside Detergents. Anal. Biochem., 162: 11~17.

[10] Harris, E. L. V. and S. Augal. 1989. Initial Planning in Protein Purification Methods: A Practical Approach. Oxford: IRL Press.

[11] Peterson, G. L. 1983. Determination of Total Protein. Meth. Enzymol., 91: 95~121.

[12] Piece, J. and C. H. Suelter. 1977. An Evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye-Binding Method for Quantitative Protein Determination. Anal. Biochem., 81: 478~480.

[13] Read, S. M. and D. H. Northcote. 1981. Minimization of Variation in the Response to Different Proteins of the Coomassie Blue G Dye-Binding Assay for Protei. Anal. Biochem., 116: 53~64.

[14] Spector, T. 1978. Refinement of the Coomassie Blue Method of Protein Quantitation. Anal. Biochem., 86: 142~146.

[15] Van Kley, H. and S. M. Hale. 1977. Assay for Protein by Dye Binding. Anal. Biochem., 81: 485~487.

[16] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagewnt. J. Biol. Chem., 193: 265~275.

[17] Markwell, M. A. K., S. M. Hass, N. E. Tolbert, and L. L. Bieber. 1981.

Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples. Meth. Enzymol., 72: 296～303.

[18] Peterson, G. L. 1977. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generaiiy Applicable. Anal. Biochem., 83: 346～356.

[19] Peterson, G. L. 1979. Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry. Anal. Biochem., 100: 201～220.

[20] Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. Meth. Enzymol., 91: 95～121.

[21] Scopes, R. K. 1982. Protein Purification: Principles and Practice. New York: Springer-Verlag, 265～266.

[22] Akins, R. E. and R. S. Tuan. 1992. Measurement of Protein in 20 seconds using a Microware BCA Assay. BioTechniques, 12: 496～499.

[23] Hill, H. D. and J. G. Straka. 1988. Protein Determination Using Bicinchoninic Acid in the Presence of Sulfhydryl Regents. Anal. Biochem., 170: 203～208.

[24] Kaushal, V. and L. D. Barnes. 1986. Protein Determination Using Bicinchoninic Acid in the Presence of Sulfhydryl Regents. Anal. Biochem., 157: 291～294.

[25] Kessler, R. J. and D. D. Fanestil. 1986. Interference by lipids in the determination of Protein Using Bicinchoninic Acid. Anal. Biochem., 159: 138～142.

[26] Pierce Chemical Company (1984) BCA Protein Assay Regent, Technical Bulletin 23225, Rockford, Ill.

[27] Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Anal. Biochem., 150: 76～85.

[28] Coluccio, L. M. and A. Bretscher. 1987. Calcium-regulated Cooperative Binding of the Microvillar 110K-Calmodulin Complex to F-Actin. J. Cell Biol., 105: 325～333.

陈 谦

第四章　蛋白质溶液的浓缩

4.1　分析方法

本章介绍的前两种蛋白质浓缩的方法，是用酸和有机溶剂沉淀的方法，此法常常导致蛋白质变性。变性的蛋白质溶解度降低，能够通过离心在沉淀中使其复性。

4.1.1　三氯醋酸沉淀法

4.1.1.1　仪器及材料

1）Eppendorf 管（小塑料离心管）
2）Eppendorf 管离心机（小型台式离心机）
3）混旋器

4.1.1.2　试　　剂

1）100% 三氯醋酸（TCA）
2）0.1N NaOH（400mg NaOH 溶于 100ml 蒸馏水）

4.1.1.3　操作步骤[7]

1）在 1ml 样品中至少要含有 5mg 蛋白质，加 100μl 100% 的三氯醋酸（TCA），混匀；
2）将蛋白质在冰浴中沉淀 30min（或在冷冻箱内放置 15 min）；
3）10 000×g 离心 5min；
4）弃去上清并用吸管吸净残留液；
5）将沉淀再悬浮于 50～100μl 0.1N NaOH 溶液，混匀。

4.1.1.4 注　　意

1）用 TCA 沉淀蛋白质，所需最低的蛋白质浓度是5μg/ml。

2）有时需要用 10% TCA 或乙醇-乙醚（1∶1）洗涤 TCA 沉淀的蛋白质，以除去 TCA[7]。

3）第 5 步不用 NaOH 溶液再悬浮 TCA 沉淀，而是用乙醇-乙醚（1∶1）洗涤 TCA 沉淀，并用缓冲液再悬浮沉淀，可能更易操作。

4）脱氧胆酸盐三氯醋酸（DOC-TCA）沉淀法是 TCA 沉淀法的一种变通形式，它可用于浓度为 1μg/ml 以下的蛋白质浓缩，该法使用范围更广。

- 1ml 样品加 0.1ml 0.15% DOC。
- 混匀并在室温下放置 10min。
- 加 50μl 100%TCA，混匀并在 10 000×*g* 离心 5min。

注意：DOC-TCA 沉淀反应不能在 SDS 存在的条件下进行[2]。

4.1.2　丙酮沉淀法

4.1.2.1 仪　　器

1）Eppendorf 管（小塑料离心管）

2）Eppendorf 管离心机（小型台式离心机）

3）混旋器

4.1.2.2 试　　剂

丙酮（或其他有机溶剂如乙醇或甲醇）。

4.1.2.3 操作步骤[7]

1）加 1ml 冷丙酮（－20℃）至 200μl 样品溶液，混匀。

2）－20℃放置 10 min。

3）小型台式离心机离心 5 min。

4）弃去上清液，使沉淀风干。

5）于 1～2 倍沉淀体积的缓冲液中再悬浮沉淀。

4.1.2.4 注意事项

1）反复用丙酮洗涤和沉淀蛋白质。

2）通过延长 −20℃的放置时间，达 2h 以上，再用 27 000×g 离心 10 min，可以定量沉淀小于 1μg 蛋白质[20]。

3）中性盐提高蛋白质在有机溶剂中的溶解度，二价阳离子降低蛋白质在有机溶剂中的溶解度[10]。

4.1.3 免疫沉淀法

通过免疫沉淀，用蛋白质特异性抗体能够定量分离目的蛋白[12]也可参见 2.3.1。免疫沉淀法由三个步骤组成，首先将特异性抗体加入细胞提取物，第二步加入经化学固定的金黄色葡萄球菌，以确保形成大量沉淀。这些细菌通过蛋白质 A 和抗体形成复合物，蛋白质 A 与免疫球蛋白的 Fc 部分有高度的亲和性。或者说，纯化的蛋白质 A 结合的 Sepharose 树脂，为从细胞提取物中分离出抗原抗体复合物，提供了一个固体基质。最后通过洗脱，除去尚未沉淀的杂质。

为了除去已破碎的或固定差的细胞，在用于免疫沉淀（作用）之前可以预先洗涤金黄色葡萄球菌细胞[11]。如果要使用蛋白质 A-Sepharose 树脂，应按厂家说明书预先膨润之。

4.1.3.1 仪　　器

1）Eppendorf 管

2）小型台式离心机

3）混旋器

4.1.3.2 试　　剂

1）蛋白质特异性抗体

2）已固定的金黄色葡萄球菌或蛋白质 A-Sepharose 树脂

3）Tris
4）NaCl
5）EDTA
6）NaN_3
7）Triton X-100
8）缓冲液 A
50mmol/L Tris-HCl（pH 7.4）
150mmol/L NaCl
5mmol/L EDTA
0.02% NaN_3

4.1.3.3 洗涤金黄色葡萄球菌细胞

1）在使用细胞 24h 之内，3000×g 离心 15min；
2）将沉淀再悬浮于原体积的含 0.5% Triton X-100 的缓冲液 A 中；
3）按上述条件离心；
4）将沉淀再悬浮于原体积0.05% Triton X-100 的缓冲液 A 中；
5）按上述条件离心；
6）沉淀悬浮于和原来体积相同的缓冲液 A 中。每次洗涤后将悬浮液置冰浴中 1h 后再离心。

4.1.3.4 免疫沉淀反应的步骤[11]

1）加过量的特异抗体于含有目的抗原的蛋白质溶液中。例如在 1ml 沉淀混合物的溶液中应加入 10～25μg 的纯化抗体。
2）混匀并在冰浴中孵育沉淀混合物 1h 以上（杂交瘤上清液需 2～3h）。
3）加足够量的金黄色葡萄球菌或蛋白质 A-Sepharose 树脂以结合沉淀混合物中所有的免疫球蛋白分子，Calbiochem

Standardized Pansorbin 细胞具有 2.0mg/ml 的免疫球蛋白结合容量。Bio-Rad Affi-Gel 蛋白质 A 具有6～7 mg/ml的 IgG 结合容量。

4）混匀并在冰浴中孵育 15～60min。

5）离心免疫沉淀物 15s，或在 4℃下 3000×g 离心 10min。

6）用含有 0.05% Triton X-100 的缓冲液 A 洗涤免疫沉淀物 3～5 次，每次洗涤时，注意小心完全地使沉淀悬浮。①再将沉淀悬浮于 100μl 洗涤缓冲液，混匀。②在 Eppendorf 离心管中离心 15s。③重复①～②步骤 2～3 次。

7）将沉淀悬浮于 100μl 样品缓冲液（见 5.1.3），或等电点聚焦缓冲液中（见 7.1.7），通常 1/8 的沉淀在凝胶电泳中就足以检测到蛋白质，当然这取决于蛋白质的起始浓度，为了有效分离蛋白质混合物，须将样品加热到 100℃。

4.1.3.5 注　　意

1）为了除去凝聚物，在使用前应预先超速离心抗体溶液（160 000×g 离心 30min 或 400 000×g 超速离心 10min）[11]。反复冻融将促进抗体的凝聚作用，因此应将抗体保存在水溶液中，为了灭活蛋白酶在使用前可将抗体在 56℃保温 30min[22]。

2）用于免疫沉淀反应的金黄色葡萄球菌能够进行培养和制备[11]，经福尔马林固定和热处理的金葡菌也可直接购入，制备的细胞收集于水溶液，－20℃贮存。

3）将抗原提取物预先吸附于洗脱过的金葡菌的方法，能够减少非特异的金葡菌的结合[5]。

4）通过改变洗脱缓冲液的 pH 值、盐浓度、或去垢剂，可提高免疫沉淀反应的特异性。

5）不同的免疫球蛋白对金葡菌结合时具有不同的亲和力[24]，兔、人、豚鼠的免疫球蛋白具有很好的结合力。

以下动物的不同免疫球蛋白亚单位具有不同的结合力。

	好	差
小鼠	IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3	IgG_1
大鼠	IgG_1, IgG_{2c}	IgG_{2a}, IgG_{2b}
山羊	IgG_2	IgG_1
羊	IgG_2	IgG_1

6）对小鼠和山羊抗体的最大结合力分别在 pH 8 和 pH 9 的条件下。将抗小鼠 IgG 抗体和金葡菌细胞预先温孵，可弥补小鼠 IgG_1 和金葡菌细胞结合力差的缺点。

7）蛋白质 G 是从链球菌中分离得到的，在结合抗体的性质方面类似于蛋白质 A。对不同种属抗体结合而言，蛋白质 G 比蛋白质 A 具有更好的结合性质（见第 12 章）。一种去除白蛋白结合域的蛋白质 G 衍生物偶联的 Sepharose 树脂已有产品面市（Pharmacia 产品）。

8）免疫沉淀反应的样品缓冲液有时需要加尿素助溶。

9）免疫沉淀反应之后释放抗原的条件是可利用 3.5mol/L $MgCl_2$，0.1mol/L 枸橼酸钠（pH3.0），3mol/L 氨水或硫氰酸钾饱和的盐酸胍，0.2mol/L 二碘水杨酸锂和 2-巯基乙醇洗涤免疫复合物。

10）免疫沉淀物通常用放射自显影检出放射性标记蛋白，或者是通过免疫印迹来识别[11]。但对照样品必须和金葡菌有交叉反应。

11）建议电泳时要有适当的对照，以减少本底[8]。

4.2 制备方法

本章的以下部分将讨论保有蛋白质活性的浓缩方法。

4.2.1 硫酸铵沉淀法

当高浓度盐存在时，蛋白质往往凝聚并析出沉淀。这一技术

称为“盐析”。不同的蛋白质在不同浓度的盐中形成沉淀，所以盐析常用于蛋白质的分离纯化。几种因素如 pH、温度、蛋白质纯度在测定各种蛋白质的盐析点时起着重要作用[24]。

选择硫酸铵是因为它具有一些优良性质，如盐析的有效性、pH 范围广、溶解度高、溶液散热少和经济适用[24]。

硫酸铵浓度常以百分浓度表示。以 X% 表示所要配制的溶液浓度，X_0% 表示开始的溶液浓度，所需的硫酸铵克数按以下公式计算：

$g = 515\ (X - X_0) / (100 - 0.27X)$（0℃时 1L 溶液，用量见附录 3）

大多数蛋白质在 55% 硫酸铵中沉淀，获得最大量蛋白质沉淀是 85% 硫酸铵溶液，以不含硫酸铵的 100ml 蛋白质溶液为起始溶液，建议按以下步骤进行盐析：

4.2.1.1 仪　　器

1）烧杯
2）磁力搅拌器和搅拌子
3）离心机和转头

4.2.1.2 试　　剂

1）硫酸铵
2）用于悬浮沉淀物的缓冲液

4.2.1.3 操作步骤

1）将盛有蛋白质溶液的烧杯放在另一装有冰水的大烧杯内，并置于磁力搅拌器上搅拌；
2）边搅拌，边徐徐加入 56.8g 硫酸铵至饱和，该步骤应在 5～10min 内完成；
3）继续搅拌 10～30min；
4）10 000×g 离心 10min 或 3000×g 离心 30min；

5）弃去上清液，将沉淀悬浮于1～2倍沉淀物体积的缓冲液中，残留的不溶性物质可能是变性蛋白，通过离心除去；

6）硫酸铵能够通过透析，超滤或脱盐柱除去。

4.2.1.4 注　　意

1）搅拌必须是有规则的和温和的。搅拌太快将引起蛋白质变性，其变性特征是起泡。用磁力搅拌器不明显产热，这一点也很重要。

2）大多数蛋白质在盐溶解后的前20min沉淀，一些蛋白质要经数小时才能完全沉淀。

3）为了平衡硫酸铵溶解时产生的轻微酸化作用，沉淀反应至少应在50mmol/L缓冲液中进行。

4）缓冲液应含有螯合剂如EDTA以除去硫酸铵中微量的重金属离子，因为这些离子对目的蛋白质是有害的[14]。

5）为确保获得最大量沉淀，使用蛋白质初始浓度至少为1mg/ml。

6）硫酸铵沉淀反应通常是贮存和稳定蛋白质的良好方法（见1.6.3）[24]。

7）少数蛋白质在硫酸铵浓度低于24%时就产生沉淀，而大多数要在80%以上才能沉淀。在纯化的初始阶段，常利用蛋白质在硫酸铵中溶解度的差异分离蛋白质。硫酸铵沉淀可除去RNA和DNA[23]。

8）在蛋白质的等电点其溶解度降低，在此条件下，静电的相互作用可导致蛋白质凝聚和沉淀[24]，在蛋白质的等电点，低浓度的硫酸铵就能沉淀蛋白质。

9）在蛋白质结晶实验中，采用硫酸铵沉淀十分有效（见第13章）。

4.2.2 有机溶剂沉淀法

将有机溶液例如丙酮和乙醇加入蛋白质溶液时，和高浓度盐类似产生沉淀，这是因为它们能够降低蛋白质的溶解度（更详细的解释见 13.2.1）。在温度为 10℃左右时蛋白质在有机溶剂中容易变性，所以在沉淀时必须特别注意冷却溶液和离心转头（0℃～4℃为佳），建议离子强度为 0.05～0.2mol/L[10,24]。

有机溶剂的浓度按体积百分数计算，累加体积并不精确。例如用简便的方法将 100ml 水溶液要配制成 50%（v/v）乙醇溶液，就是向 100ml 水溶液中加 100ml 的乙醇溶液。尽管最后总体积是 192ml。大多数蛋白质的分子量大于 15kD，一般用 50% 有机溶剂进行沉淀。

4.2.2.1 仪　　器

1）烧杯
2）磁力搅拌器和搅拌子
3）离心机和转头

4.2.2.2 试　　剂

1）丙酮或乙醇
2）再悬浮沉淀的缓冲液

4.2.2.3 操作步骤

1）在 4℃下，向 100ml 蛋白质溶液中缓缓加入 100ml 丙酮，或乙醇（冷却至－20℃），在冰浴上持续温和地搅拌；
2）在冰上持续搅拌 10～15min；
3）低温离心 10 000×g 10min；
4）除去上清液；
5）用沉淀的 2 倍体积的冷缓冲液再使沉淀悬浮。实际上变性蛋白质难于溶解，可用过滤或离心的方法除去。

4.2.2.4 注　　意

1）酸性蛋白质在二价阳离子例如 Mg^{2+} 存在下，以复合物的形式较易被沉淀。
2）大分子的蛋白质及亲水的蛋白往往在较低浓度的有机溶剂中就能析出。
3）在溶液 pH 值接近蛋白质的等电点时，蛋白质在有机溶液中的溶解度降低。

4.2.3 聚乙二醇沉淀法

聚乙二醇（PEG）是一个非离子水溶性多聚体，使用 PEG 沉淀蛋白质时，只在个别浓度下才使蛋白质稍有变性[9]。由于 PEG 溶解时散热低，形成沉淀的平衡时间短等特点，使它在蛋白质的组分分离以及结晶中成为一个有用的试剂（见第 13 章）。通常 PEG 终浓度达 30%时，蛋白质就能够达到最大量沉淀。

4.2.3.1 仪　　器

1）烧杯
2）磁力搅拌器和搅拌子
3）离心机和转头

4.2.3.2 试　　剂

聚乙二醇 6000

4.2.3.3 操作步骤

1）向 100ml 蛋白质溶液中，在缓慢搅拌下加入 150ml 50% PEG 6000（w/v 溶于蒸馏水）；
2）继续搅拌 30～60min，至完全沉淀为止；
3）10 000×g 离心 10min；
4）除去上清；

5）用1～2倍沉淀体积的缓冲液再悬浮沉淀。

4.2.3.4 注　　意

1）在等电点附近蛋白质溶解度降低。

2）用硫酸铵沉淀法能够除去PEG。也可采用离子交换层析[6]，也有报道指出高浓度PEG使凝胶过滤柱层析行为异常。

4.2.4 超　滤　法

超滤浓缩蛋白质是通过外力使蛋白质溶液通过滤膜而仍保留目的蛋白的方法。实验室超滤主要是针对小体积蛋白质溶液（几毫升），用离心力的方法使溶液很容易通过滤膜。我们以Amicon Contricon体系作为超滤的实例进行描述[1]。这个方法比上述的各种沉淀方法更不易引起蛋白质变性。

微型浓缩器初始容量有2ml以及更小的，2mg/ml的牛血清白蛋白（BSA）样品2ml离心30min可使体积浓缩至50μl以下。然而浓缩的时间依所用超滤膜的类型、缓冲液的组成以及蛋白质的种类和浓度等因素而定。通过向浓缩的蛋白质溶液中加入新缓冲液及再离心，能很方便地更换蛋白质溶液的缓冲液和脱盐[3,16]，四种型号浓缩器Centricon-3、10、30和Centricon-100分别能截留平均分子量为3，10，30和100kD的蛋白质组分。

4.2.4.1 仪　　器

1）Amicon Centricon微型浓缩器

2）磁力搅拌器和搅拌子

4.2.4.2 试　　剂

无

4.2.4.3 操作步骤

1）组装 Contricon 微型浓缩器并加 2ml 样品到样品池内（图 4.1）；

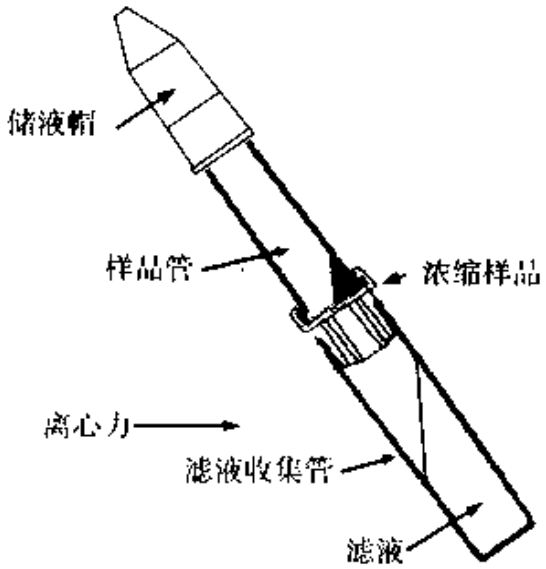


图 4.1 用 Amicon Centricon 浓缩系统浓缩蛋白质溶液

2）5000×g 离心 30min；

3）去掉样品池的过滤管，盖上回收管；

4）倒置浓缩器 1000×g 离心 2min；

5）浓缩样品将移入回收管。另外用少量缓冲液洗涤滤器，能较完全地回收蛋白质。

4.2.4.4 注　　意

1）离心时间依样品性质而定，一般含有甘油的黏性溶液或蛋白质浓度较高时，需要离心时间较长。

2）在典型的蛋白质回收率可高达 90%以上。

3）目的蛋白的分子量应大于浓缩器截流组分分子量的 30%～50%，以确保目的蛋白截留成功。

4）不同的滤膜具有不同的平均孔径，有利于根据蛋白质的大小选择合适的滤膜去浓缩蛋白。

5）Centricon 微量浓缩器的设计适用于固定角度的离心转头。由恰当的离心转头角度，使样品在达到死腔体积为 25～40μl 时，不进一步浓缩，这样防止了样品被滤干。

6）其他离心的超滤系统还有 Amicon Centriflo（7ml 容积）和 Centriprep（15ml 容积）两种浓缩器。

7）为了浓缩大体积的样品，采用加压超滤系统耗时较长。Amicon 生产的带搅拌室超滤系统可适用于几百毫升溶液的浓缩。更大体积时则使用螺旋状的、蜂窝状纤维、或盒型膜装置。

8）Penefsky（1977）[16]提出了一种可用于凝胶过滤脱盐的简单离心柱（也可参见 11.2）。

4.2.5 透 析 法

透析主要用于更换蛋白质的缓冲溶液，如果在真空或吸湿环境中也可作为浓缩蛋白质溶液的一种方法（例如 PEG、Sephadex）。将蛋白质溶液盛在一个半透膜袋内，此膜能防止蛋白质丢失而无论在常压或减压下可与周围的缓冲液进行溶质交换。

除小体积样品之外，根据扩散原理进行的透析法非常耗时，因此蛋白质浓缩和交换缓冲液通常采用超滤法。然而，在不受时间限制情况下，也可选择透析[13]，因为透析袋已成商品化，不需花时间准备，也不需要特殊仪器。

4.2.5.1 仪 器

1）烧杯

2）磁力搅拌器和搅拌子

3）透析管

4.2.5.2 试　　剂

Sephadex G-100 或 G-200

4.2.5.3 准备透析袋

市售的透析袋含有化学杂质。为了除去这些杂质，通常要用 10mmol/L 碳酸氢钠（$NaHCO_3$）/1mmol/L EDTA 溶液煮沸透析袋 30min。有人建议进行更多的处理[19]。煮沸之后，应该用双蒸水充分洗涤透析袋。洗毕，在 4℃ 贮存于 1mmol/L EDTA 溶液中，以防止微生物的污染。每隔半年必须制备新的透析袋[23]。Spectrum（公司）提供了一系列透析膜（Spectra/Pro 7），这种透析膜由再生的纤维素经处理后制成，已经除去了重金属和硫化物。

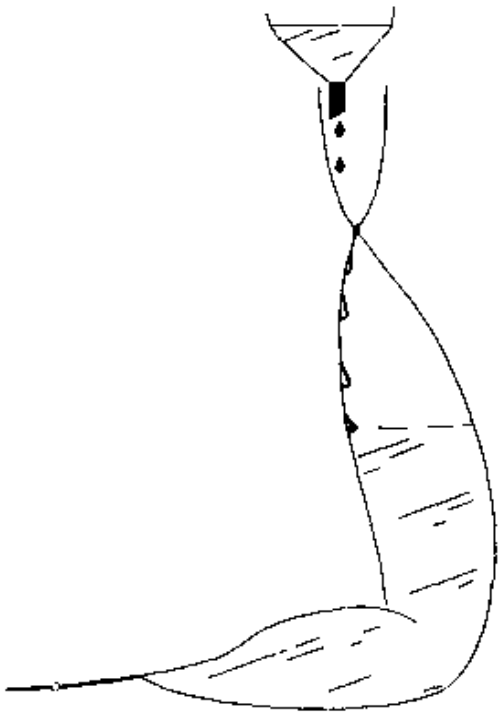


图 4.2　盛有蛋白质溶液的透析袋

4.2.5.4 步　　骤

1）在透析袋的一端打两个死结；

2）用移液管或漏斗（图 4.2）将蛋白质溶液移入透析袋内；

3）在透析袋的另一端打两个死结并将其放入 10 倍蛋白质溶液以上体积的缓冲液中，用磁力搅拌器缓慢搅拌以促进溶液交换。透析数小时后，透析达到平衡，透析缓冲液需要更换数次，使原有缓冲液成分逐渐减少。

4.2.5.5 透析缓冲液

为了浓缩蛋白质，透析袋应放入含20%聚乙二醇或5%乙二醇缓冲液中。然而，在使用PEG时，经常伴随有杂质进入透析物中，而需进一步的纯化处理。浓缩蛋白质溶液，较为迅速的方法是在4℃将透析袋埋入Sephadex G-100或G-200树脂中，有时用Calbiochem Aguacides，每半小时更换透析袋周围的树脂，3h后蛋白质溶液可浓缩5倍[23]。

4.2.5.6 注　　意

1）常使用市售的透析夹（Spectrum），从而替代透析袋打结。

2）如果用比蛋白质溶液浓度更低的盐溶液或有机溶液进行透析，由于渗透压的作用，常导致水溶液进入透析袋。所以，应留有增加溶液体积的空间，以免透析膜破裂。

3）可选择透析袋分子量截流范围是100～300000 Da（Spectrum Medical说明书）。

4）用微量透析袋进行小体积透析（10μl～0.6ml）[15]。

4.2.6 离子交换层析和冷冻干燥法简述

4.2.6.1 离子交换层析

大多数蛋白质在pH8.0时整体显示负电荷，因此，可以选择阴离子交换树脂进行浓缩[18]，关于离子交换树脂的处理及柱层析的方法见10.2。

4.2.6.2 冷冻干燥法[4]

冷冻干燥法是在冷冻状态下让样品中液体升华的一种浓缩蛋白质的方法。常用于蛋白质溶液的浓缩和贮存。

参 考 文 献

[1] Amicon Publication No. 1-259C. 1986. Centricon Microconcentrators for Small-Vol-

ume Concentration.

[2] Cabib, E. and I. Polacheck. 1984. Protein Assay for Dilute Solutions. Meth. Enzymol., 104: 415～416.

[3] Christopherson, R. I. 1983. Desalting Protein Solutions in a Centrifuge Column. Meth. Enzymol., 91: 278～281.

[4] Everse, J. and F. E. Stolzenbach. 1971. Lyophilization. Meth. Enzymol., 22: 33～39.

[5] Firestone, G. L. and S. D. Winguth. 1990. Immunoprecipitation of Proteins. Meth. Enzymol., 182: 688～700.

[6] Fried, M. and P. W. Chun. 1971. Water-Soluble Nonionic Polymers in Protein Purification. Meth. Enzymol., 22: 238～248.

[7] Hames, B. D. 1981. in B. D. Hames, and D. Rickwood, eds. Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach. London: IRL Press Limited, 290.

[8] Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

[9] Ingham, K. C. 1984. Protein Precipitation with Polyethylene Glycol. Meth. Enzymol., 104: 351～355.

[10] Kaufman, S. 1971. Fractionation of Protein Mixtures with Organic Solvents. Meth. Enzymol., 22: 233～238.

[11] Kessler, S. W. 1981. Use of Protein A-Bearing Staphylococci for the Immunoprecipitation and Isolation of Antigens from Cells. Meth. Enzymol., 73: 442～459.

[12] Lerner, M. R. and J. A. Steitz. 1979. Antibodies to Small Nuclear RNAs Complexed with Proteins are Produced by Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76: 5495～5499.

[13] McPhie, P. 1971. Dialysis. Meth. Enzymol., 22: 23～33.

[14] Nelson, N. 1986. Subunit Structure and Biogenesis of ATP Synthase and Photosystem I Reaction Center. Meth. Enzymol., 118: 352～369.

[15] Overall, C. M. 1987. Subunit Structure and Biogenesis of ATP Synthase and Photosystem I Reaction Center. Anal. Biochem., 165: 208～214.

[16] Penefsky, H. S. 1977. Reversible Binding of Pi by Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem., 252: 2891～2899.

[17] Peterson, G. L. 1977. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. Anal. Biochem., 83: 346～356.

[18] Pharmacia Fine Chemicals. Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods.

[19] Richmond, V. I., R. St. Denis and E. Cohen. 1985. Treatment of Dialysis Membranes for Simultaneous Dialysis and Concentration. Anal. Biochem., 145:

343 ~ 350.

[20] Sargent, M. G. 1987. Fifty Fold Amplification of the Lowry Protein Assay. Anal. Biochem., 163: 476 ~ 481.

[21] Shantz, E. M. 1983. PANSORBIN Staphylococcus aureus Cells: Review and Bibliography of the Immunological Applications of Fixed Protein A-Bearing Staphylococcus aureus Cells. Calbiochem. booklet., 1 ~ 56.

[22] Scheidtmann, K. H. 1989. in T. E. Creighton, ed. Protein Structure: A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 109 ~ 112.

[23] Schleif, R. F. and P. C. Wensink. 1981. Practical Methods in Molecular Biology. New York: Springer-Verlag.

[24] Scopes, R. K. 1982. Protein Purification. Principles and Practice. New York: Springer-Verlag.

萧小平

第五章　变性条件下的凝胶电泳

5.1　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

5.1.1　原　　理

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）是对蛋白质进行量化，比较及特性鉴定的一种经济、快速、而且可重复的方法。该法主要依据蛋白质的分子量对其进行分离[4,11]。SDS 与蛋白质的疏水部分相结合，破坏其折叠结构，并使其稳定地存在于一个广泛均一的溶液中。SDS 蛋白质复合物的长度与其分子量成正比。由于在样品介质和聚丙烯酰胺凝胶中加入离子去污剂和强还原剂后，蛋白质亚基的电泳迁移率主要取决于亚基分子量的大小，而电荷因素可以被忽略。SDS-PAGE 因易于操作和广泛的用途，使它成为许多研究领域中一种重要的分析技术。

我们对 SDS-PAGE 的介绍包括线性薄片胶的操作步骤，这种胶是指在两层支持的玻璃板之间形成的薄片状凝胶。由于薄片胶可在同一块胶上跑很多样品，使聚合、染色、脱色具有一致性，所以薄片胶比管状胶应用的更为广泛。对于分析性的应用，既可以减少电泳所需的时间和原材料，也可以提高分辨率，所以小的薄片胶更受人青睐。本章所介绍的实验步骤及试剂均是根据 Bio-Rad 的小凝胶系统来计算的。但这些步骤也适用于其他系统。另外，有些情况下需要使用梯度胶（见 5.2）。

5.1.1.1　应用范围

1）蛋白质纯度的分析；

2）蛋白质分子量的测定；

3）蛋白质浓度的测定；
4）蛋白质水解的分析；
5）免疫沉淀蛋白的鉴定；
6）免疫印迹的第一步（见第八章）；
7）蛋白质修饰的鉴定；
8）分离和浓缩用于产生抗体的抗原；
9）分离放射性标记的蛋白质。

5.1.1.2 染色的敏感度

1）考马斯亮蓝法染色：每条带0.1～1μg[25]。
2）银染色：每条带2～10ng[7]。

5.1.1.3 分辨范围[9]

丙烯酰胺在凝胶中的百分比	分离胶的分辨范围
15%	15～45kDa
12.5%	15～60kDa
10%	18～75kDa
7.5%	30～120kDa
5%	60～212kDa

5.1.1.4 所需时间

（1）单个步骤

制分离胶	60min
制堆积胶	30min
上样	15min
电泳	45min
染色	
考马斯亮蓝染色	30min（显示主带）
银染色	3h

（2）总共所需时间

考马斯亮蓝染色电泳：主带脱色需 3h，完全脱色约需 24～48h。
银染色凝胶电泳：6h。

5.1.2 设　　备

1）微型凝胶电泳装置
我们用 Bio-Rad 公司 Mini-Protean Ⅱ型电泳仪来作模型，因其所有操作步骤也适用于其他系统，既可节省时间和实验材料，又可对蛋白质进行高分辨率分离。
2）电源（电压 200V，电流 500MA）
3）100℃沸水浴
4）Eppendorf 管
5）微量注射器（50μl 或 100μl）
6）干胶器、真空泵或水泵
7）带盖的玻璃或塑料小容器
8）摇床

5.1.3 制　　胶

5.1.3.1 试　　剂

1）丙烯酰胺（电泳级）
2）双丙烯酰胺（N，N′-甲叉双丙烯酰胺）
3）Tris 碱
4）SDS（十二烷基磺酸钠）
5）TEMED
6）过硫酸铵
7）α-巯基乙醇
8）甘油
9）溴酚蓝
10）甘氨酸
11）盐酸
12）DTT

5.1.3.2 储 存 液

（1）2M Tris-HCl（pH8.8），100ml

称取 24.2g Tris 碱；

加 50ml 蒸馏水；

缓慢的加浓盐酸至 pH8.8（约加 4ml）；让溶液冷却至室温，pH 将会升高；

加蒸馏水至 100ml。

（2）1M Tris-HCl（pH6.8），100ml

称取 12.1g 的 Tris 碱；

加 50ml 蒸馏水；

缓慢的加浓盐酸至 pH6.8（约加 8ml）；让溶液冷却至室温，pH 将会升高 L；

加蒸馏水至总量为 100ml。

（3）10%（w/v）SDS，100ml。室温保存

称取 10g 的 SDS；

加蒸馏水至总量为 100ml。

（4）50%（v/v）甘油，100ml

到取 50ml 100%的甘油；

加入 50ml 蒸馏水。

（5）1%（w/v）溴酚蓝，10ml

称取 100mg 溴酚蓝；

加蒸馏水至 10ml，搅拌直到完全溶解；

过滤除去聚合的染料。

5.1.3.3 工 作 液

（1）A 液：丙烯酰胺储存液，100ml

30%（w/v）丙烯酰胺，0.8%（w/v）双丙烯酰胺。

注意：未聚合的丙烯酰胺是一种皮肤刺激物和神经毒素，操作时必须戴手套 见安全注意事项。

29.2g 丙烯酰胺

0.8g 双丙烯酰胺

注意：在通风柜操作，加蒸馏水至 100ml，缓慢搅拌直至丙烯酰胺粉末完全溶解，并用石蜡膜封口。可在 4℃ 存放数月。

(2) B 液：4×分离胶缓冲液，100ml

75ml 2 mol/L Tris-HCl(pH8.8)	1.5 mol/L
4ml 10% SDS	0.4%

21ml 蒸馏水

可在 4℃ 存放数月。

(3) C 液：4×堆积胶缓冲液，100ml

50ml 1 mol/L Tris-HCl(pH6.8)	0.5mol/L
4ml 10%SDS	0.4%

46ml 蒸馏水

可在 4℃ 存放数月。

(4) 10%过硫酸铵，5ml

0.5g 过硫酸铵

5ml 蒸馏水

可在密封的管内，4℃ 存放数月。

(5) 电泳缓冲液，1L

3g Tris 碱	25mM
14.4g 甘氨酸	192mM
1g SDS	0.1%

加蒸馏水至 1L

pH 应该在 8.3 左右。也可以制成 10×的储存液，在室温下长期保存。

(6) 5×样品缓冲液，10ml

0.6ml 1mol/L 的 Tris-HCl(pH6.8)	60mmol/L
5ml 50%的甘油	25%
2ml 10%的 SDS	2%
0.5ml 2-巯基乙醇	14.4mmol/L

1ml 1%溴酚蓝　　0.1%

0.9ml 的蒸馏水

可在 4℃保存数周，或在 -20℃保存数月。

5.1.3.4 工作液的用量

（1）灌制不同厚度的凝胶（两块 6cm×8cm 胶）所需的凝胶液量。

凝胶厚度	分离胶	堆积胶
0.5mm	5.6ml	1.4ml
0.75mm	8.4ml	2.1ml
1.0mm	11.2ml	2.8ml
1.5mm	16.8ml	4.2ml

凝胶液量通常应稍微多配制一点。

（2）X%分离胶的计算

A 液	X/3ml
B 液	2.5ml
蒸馏水	(7.5 - X/3) ml
10%过硫酸铵	50μl
TEMED	5μl（10μl，如果 X<8%）
总量	10ml

在灌制分离胶之前准备上述溶液。

5.1.3.5 灌制分离胶

举例：

两块 8%的分离胶（6cm×8cm×0.75mm），需 10ml

A 液	2.7ml
B 液	2.5ml
蒸馏水	4.8ml
10%过硫酸铵	50μl
TEMED	5μl

操作步骤如下：

1）组装凝胶模具可按照使用说明书，装配好灌胶用的模具。对于 Bio-Rad 的微型凝胶电泳系统，在上紧螺丝之前，必须确保凝胶玻璃板和隔片的底部与一个平滑的表面紧密接触（见图 5.1），有细微的不匹配就会导致凝胶的渗漏。

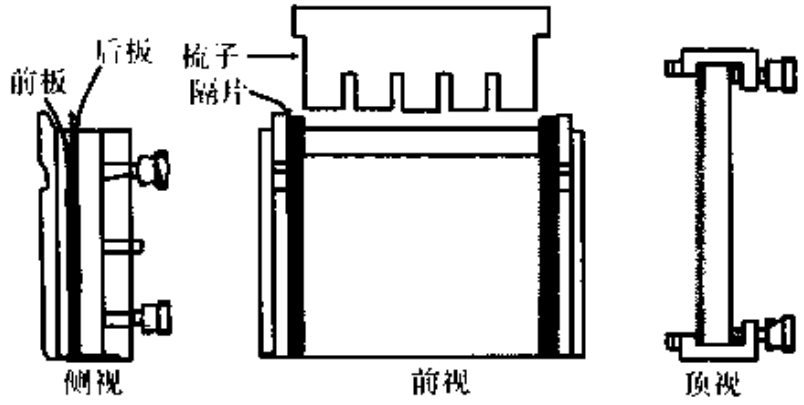


图 5.1　Bio-Rad 的 Mini-Protean 凝胶模具组装示意图

2）将 A 液、B 液及蒸馏水在一个小烧瓶或试管中混合，丙烯酰胺（A 液中）是神经毒素，操作时必须戴手套。

3）加入过硫酸铵和 TEMED 后，轻轻搅拌使其混匀（过量气泡的产生会干扰聚合）。凝胶很快会聚合，操作要迅速。

4）小心将凝胶溶液用吸管沿隔片缓慢加入模具内（见图 5.2），这样可以避免在凝胶内产生气泡。

5）当加入适量的分离胶溶液时（对于小凝胶，凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5cm 或距梳子齿约 0.5cm，见图 5.3），轻轻在分离胶溶液上覆盖一层 1～5mm 的水层，这使凝胶表面变得平整。

6）等待 30～60min，使凝胶聚合。当凝胶聚合后，在分离胶和水层之间将会出现一个清晰的界面，可以微微倾斜模具，检测凝胶是否聚合。另外的办法是将灌完分离胶

后剩余的凝胶溶液置于一个小容器内，作为检测凝胶聚合的标志。如果凝胶渗漏，但还没有覆盖水层，可以回收分离胶溶液，重新装配玻璃板和隔片，在凝胶聚合之前重新灌胶。分离胶可在4℃储存一周。

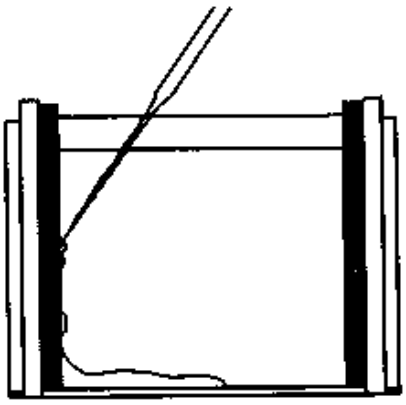


图 5.2 用滴管将凝胶溶液加入凝胶模具

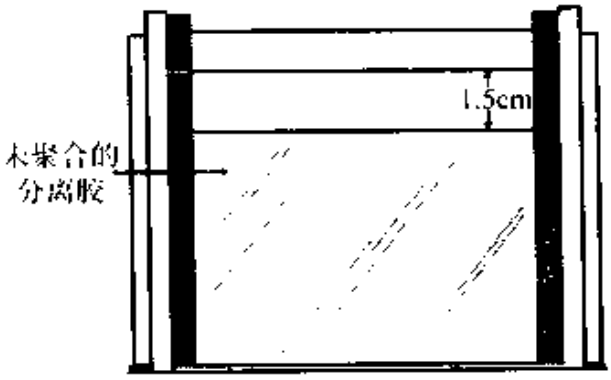


图 5.3 分离胶聚合之前

5.1.3.6 灌制堆积胶

举例：

两块5%堆积胶（6cm×8cm×0.75mm），4ml

蒸馏水	2.3ml
A液	0.67ml
C液	1.0ml
10%过硫酸铵	30μl
TEMED	5μl

按以下步骤操作：

1）吸尽覆盖在分离胶上的水；

2）将A液、C液和蒸馏水在三角烧瓶或小试管中混合；

3）加入过硫酸铵和TEMED，并轻轻搅拌使其混匀；

4）将堆积胶溶液用吸管加至分离胶的上面，直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端（见图5.4）；

5）将梳子插入凝胶内，直至梳子齿的底部与前玻璃板的顶

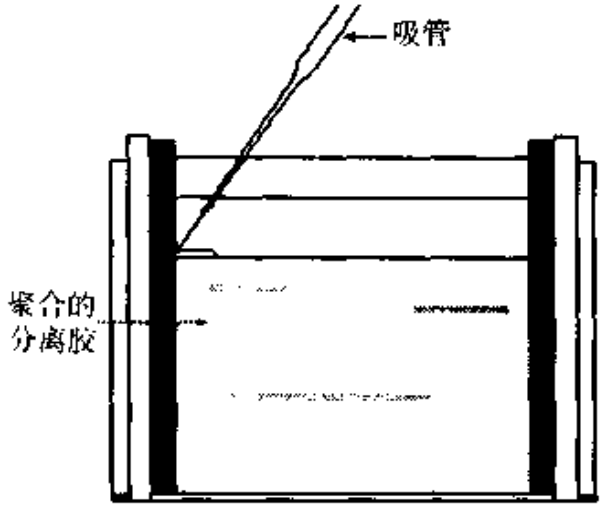


图 5.4　将堆积胶溶液用吸管加入凝胶模具

端平齐（见图5.5 和图 5.6）。必须确保梳子齿的末端没有气泡。将梳子稍微倾斜插入可以减少气泡的产生；

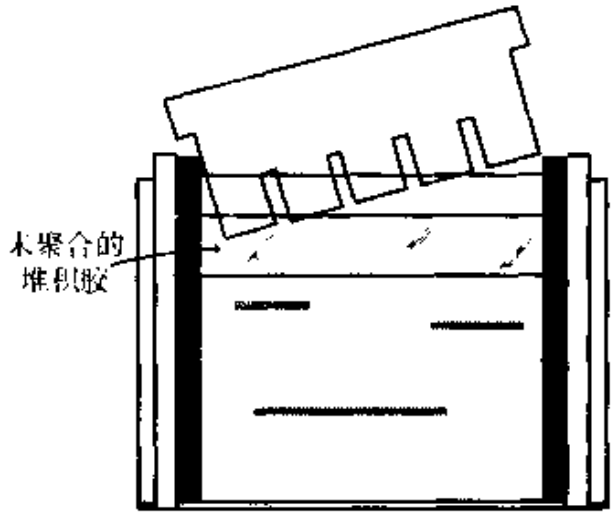


图 5.5　将加样孔梳子插入堆积胶

6）约 30min 凝胶聚合；

7）凝胶聚合后，小心拔出梳子，不要将加样孔撕裂；

8）将凝胶放入电泳槽内，如果使用 Bio-Rad 的微型凝胶系统，可预先接好电极；

9）将电泳缓冲液加入内外电泳槽中，使凝胶的上下端均能

浸泡在缓冲液中（见图 5.7）。

注意：①检查加样孔中是否有气泡及损坏，损坏的加样孔可以尝试用微量注射器加以修正。②粘附在凝胶底部的气泡必须除去，以保证电流的畅通。③在加样之前先用电泳缓冲液冲洗一下加样孔，这样可以去除未聚合的丙烯酰胺和其他污物。

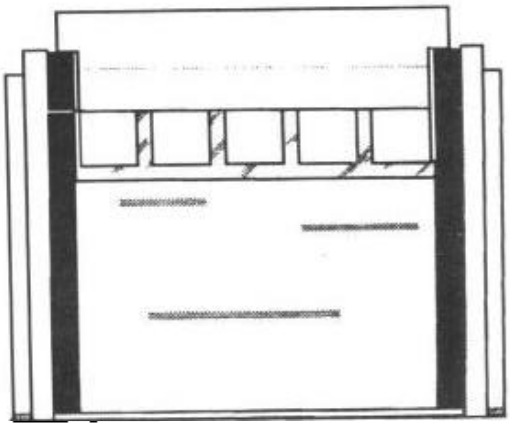


图 5.6　堆积胶聚合之前

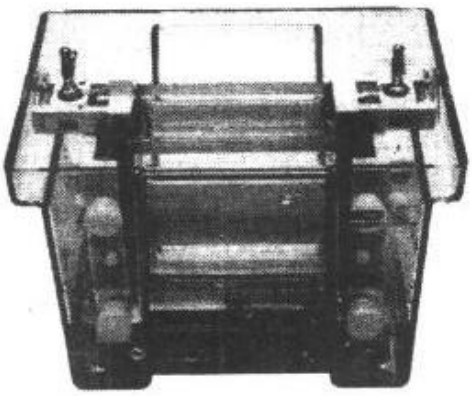


图 5.7　Bio-Rad 公司的 Mini-Protein 电泳槽

5.1.3.7　注　　意

1）试剂溶液通常储存在 4℃，在混匀或灌胶之前无须恢复到室温。

2）凝胶不聚合的原因：

- 过硫酸铵或 TEMED 的量不够，可增加催化剂的量。
- 试剂质量差，使用电泳级的试剂。
- 过硫酸铵和 TEMED 失活，配制使用新鲜的储存液。
- 聚合时温度太低，将凝胶置于室温。

3）聚合反应的速度可以通过增减所使用聚合催化剂的量来加以改变。

4）在聚合反应中，特别是对于高浓度的凝胶，出现凝胶裂纹的主要原因是过量产热，可使用冷却的试剂[9]。

5）对丙烯酰胺液脱气加速聚合作用，但这一步可以省略。

6）如果在 4℃下进行电泳，十二烷基硫酸锂（LiDS）可以用来取代 SDS，在低温下 LiDS 不会沉淀。

7）蛋白质条带的清晰与否取决于所使用的 SDS 的级别及品牌。可以参考各种商业来源的 SDS 纯度的分析和讨论[19]。

8）聚丙烯酰胺凝胶电泳，可以分离从 50～500kDa 范围的蛋白质分子[17]。

5.1.4 制备样品和上样

5.1.4.1 每孔的上样量（Bio-Rad 的微型凝胶系统）

凝胶的厚度	1 孔	5 孔	10 孔	15 孔
0.5mm	0.7ml	45μl	16μl	9μl
0.75mm	1.0ml	68μl	24μl	14μl
1.0mm	1.4ml	90μl	32μl	18μl
1.5mm	2.1ml	135μl	48μl	27μl

5.1.4.2 操作步骤

1）将蛋白质样品与 5×样品缓冲液（20μl + 5μl）在一个 Eppendorf 管中混合；

2）100℃加热 2～10min；

3）离心 1s，如果有大量蛋白质碎片则应延长离心时间；

4）用微量注射器将样品加入样品孔中（见图 5.8）。将蛋白质样品加至样品孔的底部，并随着染料水平的升高而升高注射器针头。避免带入气泡，气泡易使样品混入到相邻的加样孔中。

注意：①在加入不同的样品之前，一定要用电泳缓冲液或蒸馏水冲洗注射器。②在最外侧的加样孔中加入蛋白质分子量标准品（参见 5.1.1）。③如果在凝胶放入电泳槽之前加样，当把凝胶放入电泳槽中时，由于电泳缓冲液的作用，会导致各加样孔之间的交叉污染。④虽然堆积胶的堆积作用可以减少因加样体积不同所产生的差别，但是在进行分析性工作时还应保持相同的上样量。⑤为了使凝胶孔清晰可见，可在堆积胶中加入溴酚蓝至终浓度为 1mg/ml[25]。

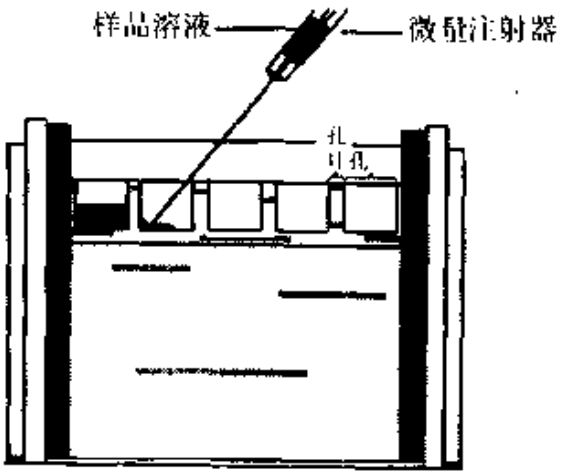


图 5.8　将蛋白质样品加入样品孔中

5.1.4.3　注　　意

1）每孔上样的最低蛋白质量（每一条蛋白质条带）：0.1μg（考马斯亮蓝染色）-2ng(银染色)[7]。

2）每孔上样的最大蛋白质量（蛋白质混合物）：20～40μg。

3）样品缓冲液中蛋白质沉淀的主要原因是：蛋白质的变性；SDS的量太少；还原剂的量太少；过度的酸性环境；K^+的出现导致SDS的沉淀[9]。

4）在准备样品的过程中，如果样品混合物变为黄色，则说明溶液太酸，加入NaOH直至溶液变为兰色；否则，蛋白质样品就会出现反常迁移。

5）为了避免边缘效应，在未加样的孔中加入等量的样品缓冲液。

6）样品不能沉到加样孔底部的原因是：样品缓冲液中没有足够的甘油，或梳子安放的不合适，使孔底留有聚合的丙烯酰胺[9]。

7）如果在上样之前没有对煮沸的样品进行离心，便会出现蛋白质条带的拖尾现象。拖尾是因为在堆积胶中蛋白质浓度过高而产生的沉淀所致。一般认为聚合的蛋白质在

电泳过程中会逐渐溶解。对蛋白质样品进行稀释可以得到改善[9]。

8）样品缓冲液中煮沸的样品可以在－20℃保存数周，但是反复冻融会导致蛋白质的降解。

9）对于储存在－20℃已煮沸的样品，上样前应先使样品升温至室温，使SDS沉淀溶解[9]。

10）上样时，小心不要使样品溢出，避免污染相邻的加样孔。

5.1.5 电　　泳

5.1.5.1 操作步骤

1）将电极插头与适当的电极相接。电流应流向阳极；

2）将电压调至200V（保持恒压；对于两块0.75mm的胶来说，电流开始时为100mA，在电泳结束时应为60mA；对于两块1.5mm的胶来说，开始时应为110mA，结束时应为80mA。）；

3）对于两块0.75mm的凝胶，染料的前沿迁移至凝胶的底部约需30～40min（1.5mm的凝胶则需40～50min）；

注意：①凝胶在电泳过程中会升温，然而不影响蛋白质的分离。低电压会使产热减少，迁移减慢，分辨率稍有下降。②电泳后，在染色前可以将凝胶放置数小时没有不良影响。除非是低浓度丙烯酰胺凝胶，蛋白质会开始扩散。③凝胶电泳时使用高电流是非常危险的。在关闭电源之前千万不要拔出电极。如果使用的电泳仪并没有完全与外界隔开。便应留有醒目的标记来提示电泳正在进行。

4）关闭电源；

5）从电极上拔掉电极插头；

6）从电泳槽中取出凝胶玻璃板；

7）小心移动两玻璃板之间的隔片，将其插入两块玻璃板的一角。轻轻撬开玻璃板，凝胶便会贴在其中的一块板上。

5.1.5.2 注　　意

1）电泳中，只有在恒压的条件下电泳期间蛋白质才可以保

持恒定的迁移速率[9]。

2) 电泳中，出现不规则的蛋白质迁移带多是因为电流不稳定。因此要确保上下电泳槽中的电泳缓冲液与凝胶保持很好的接触。其他可能的原因包括：样品孔中加样太多；样品中盐浓度太高；边缘效应。在凝胶边缘电泳条带出现“微笑”状或样品泳动的速度减慢，可能是因为凝胶的中间比两侧更热。降低电压便可改善这一状况。

5.1.6 考马斯亮蓝染色

这种染色方法在单条电泳带中蛋白质最小检出量为 0.1μg 的蛋白（如图 5.9）。通常可以根据所需要的敏感度来选择是使用考马斯亮蓝染色或是银染色。

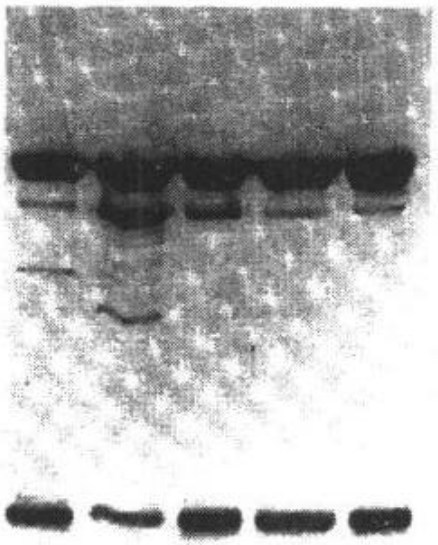


图 5.9 考马斯亮蓝染色电泳凝胶 图示自牛脾不同纯化阶段的肌动蛋白（最上条带）及其抑制蛋白（下部条带）的电泳图谱。电泳条件为 0.75mm 厚胶，13% 丙烯酰胺，电压 200V，电泳 40min，蛋白质量为 10μg/孔

5.1.6.1 试 剂

1) 考马斯亮蓝 R-250

2）甲醇-CH_3OH

3）冰醋酸

5.1.6.2 储 存 液

1）考马斯亮蓝染液，1L

考马斯亮蓝 R-250	1.0g
甲醇	450ml
蒸馏水	450ml
冰醋酸	100ml

2）考马斯亮蓝脱色液，1L

甲醇	100ml
冰醋酸	100ml
蒸馏水	800ml

5.1.6.3 染色过程

1）戴上手套避免将手指印留在电泳胶上，将胶移入一个小的盛有少量考马斯亮蓝（20ml 已经足够）的容器内（小心不要将胶撕破）。或将玻璃板连同凝胶浸在染料中轻轻振荡直至凝胶脱落；

2）对于 0.75mm 的凝胶，可在摇床上缓慢震荡 5～10min，对于 1.5mm 的凝胶，则需 10～20min，在染色和脱色过程中要用盖子或封口膜密闭容器口；

3）弃去染液，将凝胶在水中漂洗数次。戴手套以避免将双手染色；

4）加入考马斯亮蓝脱色液（约 50ml），清晰的条带很快会显现出来，大部分凝胶脱色需要 1h，使用过的脱色液则可用水冲洗掉。为了脱色完全，需数次更换脱色液并震荡过夜。

5.1.6.4 注　　意

1）染色和脱色一般用最短的时间已足够。但如果染色过夜将需要更长的时间脱色，如果脱色后染色显得并不彻底，可以对凝胶重新进行染色。

2）对于低丙烯酰胺浓度较脆的凝胶，可以用一张 Whatman3M 的滤纸贴在玻璃板上的凝胶上，将其转移至染色容器内，然后将滤纸与凝胶一块揭下来，并将凝胶从滤纸上冲洗至染色容器内。

3）高浓度的 SDS 会干扰考马斯亮蓝的染色[9]。

4）不均匀的染色可能是因为染料没有完全穿透凝胶，也许是加入染料的量不足，或者是振荡的不够充分。

5）非特异性的考马斯亮蓝染色主要是由于未溶解的染料的沉积而成，应将染料溶液过滤后再用。

6）染料易被阳性电荷离子基团所吸引（如 Lys、Arg），因此碱性蛋白质染色较深，一些酸性蛋白质则不易检测到[21]。

7）如果考马斯亮蓝染色的敏感度不够，凝胶可经漂洗后再进行银染色，可以参考银染的具体步骤。

8）染色和脱色可用同一个容器。用清洁剂或有机溶剂，如甲醇或乙醇沾湿的纸或纱布，既可将容器中的染色擦尽。

5.1.7 银　染　色

银染对单一电泳带检出蛋白质最低量为 2ng。

5.1.7.1 试　　剂

1）硝酸银（注意：不同批次的硝酸银灵敏度可能不同）

2）氢氧化钠（NaOH）

3）14.8mol/L（30%）的氨水

4）柠檬酸

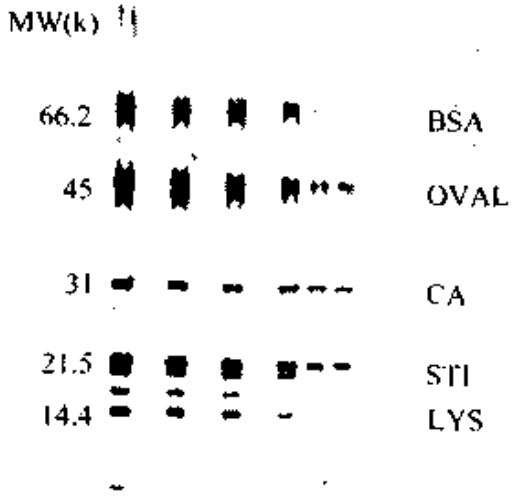


图5.10　银染电泳胶将Bio-Rad公司的低分子量标准蛋白试剂盒的蛋白质样品作为储存液稀释到以下浓度(μg/ml):牛血清白蛋白BSA(1.2),卵蛋白OVAL(1.7),碳酸酐酶CA(1.9),大豆胰蛋白酶抑制剂STI(1.8),溶菌酶LYS(1.4)。在1~8孔中按以下比例稀释后上样2.0μl:1(1∶40),2(1∶53),3(1∶80),4(1∶160),5(1∶320),6(1∶400),7(1∶1600),8(1∶4000),上样量从0.6~96ng。一般2ng可以检出

5）38%的甲醛

6）甲醇（试剂纯）

7）Kodak rapid fix

8）Kodak hypo clearing agent

5.1.7.2　工作溶液

（1）提前配制

0.36%NaOH

1%的柠檬酸（可以储存数周）

50%甲醇/10%醋酸

1%的醋酸

(2) 新鲜配置

- 溶液 A

  0.8g 硝酸银溶于 4ml 蒸馏水中。

- 溶液 B

0.36%NaOH	21ml
14.8M (30%) 氨水	1.4ml

- 溶液 C

  将溶液 A 逐滴加入溶液 B 中，并不停的搅拌，使棕色沉淀迅速消失，然后加蒸馏水至 100ml，15min 内使用。

- 溶液 D

  将 0.5ml 1% 柠檬酸和 50μl 38% 的甲醛混合，加水至 100ml。溶液必须新鲜。

5.1.7.3 染　　色

1) 戴上手套，将凝胶移至一个盛有 50%甲醛和 10%醋酸混合液的小容器内，至少浸泡 1h，换液 2～3 次；

2) 用清水漂洗 30min，期间至少换水 3 次；

3) 准备溶液 A、B、C；

4) 将凝胶移入一个干净的容器内，在持续温和振摇下用 C 液染色 15min；

5) 用去离子水漂洗凝胶，在轻轻振摇下浸泡 2min；

6) 准备溶液 D；

7) 将凝胶移至一个干净的容器内，用溶液 D 洗涤，显色。银染的电泳带一般在 10min 内出现，否则更换溶液 D。如果背景已开始变为淡黄色，则应该停止反应；

8) 将凝胶浸入 1%的醋酸终止反应；

9) 在蒸馏水中漂洗凝胶至少 1h，换水三次；

10）如果蛋白质染色太深，则可用 Kodak Rapid Fix 或 Kodak Rapid Unfix 使电泳胶脱色；再用 Kodak clearing agent（如 Orbit）终止脱色，然后用 50% 甲醇/10% 的醋酸漂洗；

11）将凝胶保存于水中或进行干胶。

5.1.7.4 染色过程中的注意事项

（1）步骤 1

- 高质量的甲醇染色效果反而差；因此，应使用试剂纯的甲醇。
- 凝胶在第一次甲醇浸泡中可持续存放数周。
- 一种更快捷的方法是将凝胶在 70% PEG2000 中浸泡 30min，然后直接进行第三步[15]。
- 含有琼脂糖的凝胶在 20% TCA 中固定效果更好。

（2）步骤 4

溶液 C 干燥后极易爆炸，因此宜将其收集在一个瓶中，并加入等体积的盐酸生成 AgCl 沉淀[8]，Ag 用清水冲入下水道会造成重金属对环境的污染，最好按市政管理部门的要求进行处理。

（3）步骤 7

5% ~ 10% 的甲醇可以用来减慢显色反应速度。

（4）步骤 10

可用 10% 的甲醇来减缓 Rapid Fix 的脱色。

5.1.7.5 注　　意

1）银染主要出现在胶的表面，用薄胶（0.5 ~ 0.75mm）可提高灵敏度。文献［14］给出另一种银染方法。

2）对于考马斯亮蓝染色的胶，可将凝胶用甲醇漂洗后，继续进行银染，从第二步开始操作。乙酸会干扰银染，因此要确保将凝胶中乙酸完全洗净。但如果凝胶被过度银

染，则可用 Rapid Fix 脱色并用考马斯亮蓝二次染色。

3）不同的蛋白质对银染的反应是不一样的，尤其是碱性蛋白质染色效果差。因此，不适宜用银染测定不同蛋白质的比例。

4）在凝胶染色的浸泡过程中，缓慢的振荡（40～60r/min）是非常重要的。

5）凝胶表面的裂纹多是由于压力、手印及表面干燥所致，所以在凝胶染色操作的全过程中都应戴手套。

6）凝胶背景呈均一的黑色多是因为水中的杂质所致，所以溶液的配制都应使用导电率小于 1μS 的去离子水。

7）如果染色后有呈灰尘或云雾状的，灰色或棕色的沉淀出现在凝胶表面，这可能是因为在步骤 2、5、9 中未充分的漂洗所致，或者是染色过程中温度太低。

8）较深的银染背景主要是丙烯酰胺中的杂质所致。

9）在最初甲醇洗脱时就应先除去像甘油、尿素，甘氨酸、Triton X-100 和两性电解质这些干扰性的物质[35]。

10）在室温操作，温度的波动往往会影响银染效果，恒温水浴可以解决这个问题[1]。

11）当蛋白质样品含有核酸或金属时，银染便不会凑效。改变固定剂和染色之前对胶进行漂洗可以改进染色效果[32]。

12）SDS 凝胶中的 α-巯基乙醇会导致在 60kDa 或 67kDa 处出现两条水平线。减少 α-巯基乙醇用量便可消除这一现象[12]。

13）凭借戊二醛预处理可以使各种蛋白质的染色提高 40 倍[6]。对于与戊二醛交联的蛋白质，在步骤 1 后，用 10%的戊二醛在通风柜中洗 30min，然后用蒸馏水连续冲洗 2h[7]。此后，凝胶可以在蒸馏水中保存数周，25%的戊二醛储存液可以在冰箱中保存。

14）染色使用的玻璃容器必须非常清洁。用泡酸的方法处理

玻璃容器可满足上述要求。

15）银染后应尽快照相，随着时间的延长，蛋白质银染带会褪色，而背景会加深[8]。

16）银染后^{125}I、^{32}P、^{35}S、^{14}C的放射自显影效果很好，但H^3的放射自显影不能显相，因为大部分同位素射线被染色所吸收[8]。

5.1.8 干　　胶

5.1.8.1 材　　料

1）Whatman 3MM 滤纸

2）玻璃纸或标准的塑料保鲜膜

5.1.8.2 操作步骤

1）将凝胶置于一个干净的表面上（玻璃板或洁净的操作台上）；

2）用蒸馏水做润滑剂，调整加样孔间隔胶使其保持垂直；

3）用一张 10cm × 12cm 的 Whatman 3MM 滤纸覆盖凝胶，将滤纸连同凝胶从玻璃板或操作台上揭下来，凝胶会粘在滤纸上；

4）用一张玻璃纸或塑料保鲜膜覆盖在凝胶的表面，小心不要将气泡裹进去，这样会导致凝胶的破裂。可用一个试管作为卷轴推过可以有效的除去气泡；

5）将 Whatman 滤纸与凝胶置于干胶器上，开启加热和抽真空开关，并盖上带有密封圈的盖子[24]。

5.1.8.3 注　　意

1）一块 0.75mm 的凝胶进行干胶需 1h，一块 1.5mm 的凝胶约需 2h 抽干。但这也取决于所用真空泵的性能。

2）使用厚度大于 1mm 的滤纸可防止凝胶发生卷曲[24]。

3）凝胶也可在室温和常压下，置于玻璃纸内进行干胶。这

种在透明的纸内干燥的凝胶可进行光密度的测定[24]。

4）在干胶过程中出现凝胶干裂现象，特别是对于高浓度的丙烯酰胺凝胶常见。主要原因是在凝胶完全干燥之前，真空系统已被破坏[9]。将凝胶浸泡在5%的甘油中过夜可以减少干胶过程出现干裂[24]。

5.1.9 讨　论

1）异常迁移的原因及解决办法[31]：

- 蛋白质与SDS不完全结合引起电泳迁移速率下降；在下述条件下会出现这种情况：①没有被完全还原的蛋白质；②化学性交联的蛋白质；③糖蛋白、酸性蛋白、马来酰化蛋白质或琥铂酰化蛋白质。
- 蛋白质固有的净电荷数决定着其与SDS联结后所带的电荷总数。例如组蛋白，在电泳中会有相对异常的迁移率
- 分子量在15kDa以下的蛋白质在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳中比较反常，主要是因为它们的荷质比与大的蛋白质不同，而且小粒子在凝胶中迁移时其特性会发生改变。SDS尿素胶可以部分的解决这些问题（见5.3）。SDS尿素PAGE分离蛋白质范围是1000～100000kDa。
- 如果在应出现单一蛋白质条带的情况下面出现了双带，可能是部分蛋白质样品没有被完全还原，增加样品缓冲液中α-巯基乙醇的浓度可解决这一问题。但也可能是蛋白质水解引起的。
- 很多疏水的蛋白质（如：大肠杆菌乳糖通透酶）可以联结过量的SDS，并显示很高的电泳迁移率。提高丙烯酰胺浓度可以得到更精确的分子量[22]。用去垢剂抽提的蛋白质需要用去垢剂维持其活性和可溶性，因此在有去垢剂的情况下进行电泳可以提供最满意的分辨率。然而和凝胶微粒大小相同的去垢剂，如Triton X-100（见第一章，表1.2），穿透聚丙烯酰胺凝胶能力较差[19]。另外，

如果用非离子型去垢剂，蛋白质迁移距离短于同样荷质比的蛋白质，并且其迁移率与分子量没有直接比例关系。

2）样品中高浓度的阳离子可能会导致 SDS 的沉淀，应该在加入样品缓冲液之前将其除去。

3）一些蛋白质需要快速固定，否则它们会扩散出凝胶[33]。尤其当使用超薄胶时（<0.5mm），必须在染色之前进行固定。20% 的 TCA 可以作为一种固定剂[1]。

4）过硫酸铵会干扰酶的活性，预电泳或用核黄素有助于排除这一干扰[4]。

5）SDS 经常会抑制酶的活性，有多种方法可用来从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中恢复酶的活性（见 5.4.4）。对于 SDS-PAGE 后酶的处理，可以参考文献 [26]。

6）清洗电泳仪和玻璃板时使用温和的去垢剂，便足以使其变得清洁。尤其是对考马斯亮蓝染色也能洗净。

7）玻璃板的封口：Bio-Rad 的 Mini-Protean 电泳仪并不需要对玻璃板进行封口，如果使用需要封口的凝胶模具系统，我们建议使用 1.5% 的热的琼脂糖溶液来熔封凝胶玻璃板。

8）低浓度的丙烯酰胺凝胶（<3%）可以用 0.5% 的琼脂糖进行强化[9]。

9）对于浓度超过 12% 的丙烯酰胺凝胶，一般推荐使用丙烯酰胺：双丙烯酰胺之值更高的凝胶[4]。

10）*T*% 和 *C*% 是通常用来表示凝胶中丙烯酰胺组成的指标。*T*% 是指丙烯酰胺总的含量（w/v），*C*% 是指交联的丙烯酰胺（即双丙烯酰胺与丙烯酰胺单体的比值（w/w））。由以下公式得出：

$$T\% = [\text{丙烯酰胺(g)} + \text{双丙烯酰胺(g)}/\text{总体积(ml)}] \times 100\%$$

$$C\% = [\text{双丙烯酰胺(g)}/\text{丙烯酰胺(g)} + \text{双丙烯酰胺(g)}] \times 100\%$$

11）薄片胶因其既能提高分辨率，又能缩短电泳和染色时间，而成为多数实验者的首选。更大的凝胶，可在需要分离更多的蛋白质的情况下使用[20]。Pharmacia Phastsystem 代表了凝胶电泳在减小凝胶尺寸和缩短电泳时间方面的里程碑。

12）蛋白质的化学计量可以通过考马斯亮蓝染色凝胶的光密度扫描和积分测出[31]。

13）一个简单的检测酶的蛋白质溶解作用的方法是：将样品缓冲液加入到两份完全相同的蛋白质样品中，只对其中的一份在 100℃进行煮沸，然后同时进行电泳[31]。

14）可以参考文献［20］或文献［23］的方法除去样品中核酸。

15）准备蛋白质分子量标准品：每个泳道加入 2μg 纯化的蛋白质分子量标准便足够。如果要加入混合的标准蛋白质，则可根据这一标准进行推断（例：对于有 5 个标准蛋白质的混合物，则需在每孔加入 10μg 的标准蛋白质溶液）。可以将标准蛋白质分装成小份，这样可以避免反复冻融。必须注意的是与染料的结合使分子量标准蛋白的分子量增加。

5.1.10 安全注意事项

1）丙烯酰胺：有剧毒，可导致中枢神经麻痹，也可能有致癌和致畸变作用。可被正常皮肤吸收。如果皮肤接触了丙烯酰胺的粉末或溶液相，立即用肥皂水冲洗。未聚合的丙烯酰胺在过量催化剂以固体废物形式处理[13]。

2）过硫酸铵：可以用水稀释后冲洗弃之。

3）TEMED：用避光的瓶子在 4℃保存[9]。有报道认为保存 10～12 个月后活性显著下降。

4）硝酸银：有毒及皮肤刺激。混合的氢氧化银铵溶液（溶液 C）水分蒸干后形成烈性炸药，因此用完后 Ag^{2+} 应立

即加盐酸使其沉淀[13]。

5）甲醛：甲醛的蒸气有很强刺激性，置于密闭的容器内，在室温下保存。

5.2 梯 度 胶

5.2.1 引 言

在凝胶电泳中使用丙烯酰胺梯度胶比使用线性胶有两大优点。一是在高浓度丙烯酰胺条件下可以增加蛋白质的分子筛作用，从而使低分子量蛋白质形成清晰的条带。另一是梯度胶可以在一块胶内分离分子量范围更大的蛋白质（如5%～20%的凝胶可以分离15kDa～200kDa的蛋白质；而3%～30%的凝胶可以分离13～950kDa的蛋白质）。丙烯酰胺在梯度胶中的百分比可根据需要来定[9,29]。

5.2.2 仪 器

1）梯度仪

2）蠕动泵

3）连接管

5.2.3 凝胶的制备

5.2.3.1 工作溶液

（1）溶液A

30%丙烯酰胺，0.8%双丙烯酰胺（5.1.3）

（2）溶液B

1.5mol/L Tris-HCl（pH8.8），0.4% SDS（5.1.3）

（3）溶液C

0.5mol/L Tris-HCl（pH6.8），0.4% SDS（5.1.3）

5.2.3.2 5%～20%分离胶所需的溶液量

	5%	20%
溶液 A	1.67ml	6.67ml
溶液 B	2.5ml	2.5ml
蒸馏水	5.8ml	…
蔗糖	…	1.5g（占总容积约 0.8ml）
10%过硫酸铵	50μl	50μl
TEMED	5μl	5μl

5.2.3.3 制备分离胶

灌制丙烯酰胺梯度胶与线性胶最大的区别就在于需要使用梯度仪。恰好在分离胶溶液灌入凝胶模具之前，梯度仪将高浓度和低浓度的丙烯酰胺溶液相混合。在没有蠕动泵的情况下，凝胶溶液依靠重力灌入模具内。高浓度丙烯酰胺溶液内加入蔗糖可以稳定梯度的形成。

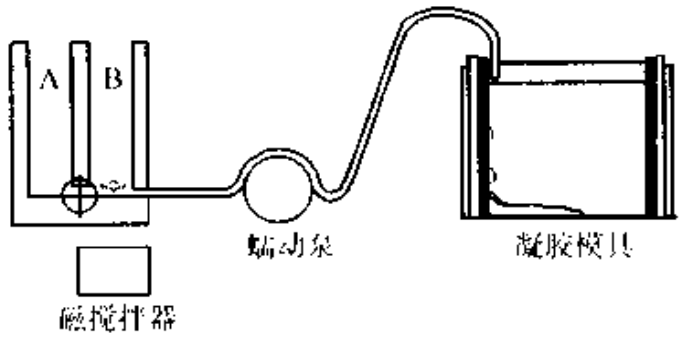


图 5.11 灌制梯度胶的装置

1）准备好凝胶模具，并装配好梯度混合器。磁力搅拌器置于梯度混合器的下方，这样就不会使混合器的凝胶槽内产热。调节蠕动泵至流速为 3ml/min；

2）准备好未加 TEMED 的分离胶溶液；

3）将 TEMED 加至分离胶溶液内，轻轻搅拌混匀，此时动

作要迅速，因为凝胶很快会聚合；

4）将适量的两种分离胶溶液分别加入到混合器的两个凝胶槽中（例：对于 10ml 的凝胶，各加 5ml 至每个槽中），高百分比浓度的丙烯酰胺溶液应加入至 B 槽中；

5）打开磁力搅拌器，接通两个槽之间的连通管；

6）打开蠕动泵，形成梯度胶；

7）当分离胶灌完后，在胶的顶部轻轻覆盖约 1～5mm 的水层；

8）用清水冲洗梯度混合器和连接管，防止残留的丙烯酰胺聚合后堵塞；

9）堆积胶的制备，可以参见 5.1.3 节。

5.2.3.4 注　　意

1）堵塞在连通管中或梯度仪凝胶槽中的气泡致使形成的梯度不均一。

2）凝胶溶液放在冰箱 4℃ 预冷，可以延缓灌胶时凝胶聚合的时间。

3）为了延缓梯度凝胶聚合的时间，可用核黄素来替代过硫酸铵。核黄素的终浓度为 0.0005%（储存液浓度为 0.004%），将凝胶暴露于日光，或白色、蓝色的荧光下即可聚合[9,29]。

5.3　SDS-尿素胶

5.3.1　引　　言

当蛋白质的电荷性质与其质量明显相关时。小分子蛋白质在 SDS-PAGE 中的迁移率便不再与它们的分子量成比例。在这种情况下通常使用 SDS-尿素胶[20,28]。另外，SDS-尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳对于免疫沉淀和在低离子强度下不溶的膜蛋白是非常有用的。除了以下所列举的凝胶组成外，所有的操作均与 SDS-PAGE 相同（参见 5.1）。

5.3.2 制　　胶

5.3.2.1 工作溶液

（1）溶液 A

30%丙烯酰胺，0.8%双丙烯酰胺（5.1.3）

（2）溶液 B

1.5mol/L Tris-HCl（pH8.8），0.4% SDS（5.1.3）

（3）溶液 C

0.5mol/L Tris-HCl（pH6.8），0.4% SDS（5.1.3）

5.3.2.2 溶液的数量

（10ml）	X%分离胶	X%堆积胶（4ml）
A 液	3/Xml	X/7.5ml
B 液	2.5ml	0 ml
C 液	0 ml	1ml
尿素	4.8g（3.6ml）	1.9g（1.4ml）
蒸馏水	3.9－X/3ml	1.6－X/7.5ml
10%过硫酸铵	50μl	30μl
TEMED	5μl	5μl

注意：上述计算分离胶和堆积胶的公式仅适用于丙烯酰胺浓度在 12%以下时，对于更高浓度的丙烯酰胺，则应在 A 液和 B 液中加入尿素[30]

举例：

（10ml）	8%分离胶	5%堆积胶（4ml）
溶液 A	2.7ml	0.67ml
溶液 B	2.5ml	0 ml
溶液 C	0 ml	1.0 ml
尿素	4.8g	1.9g
蒸馏水	1.2ml	0.93ml

10%过硫酸铵	50μl	30μl
TEMED	5μl	5μl

电泳的条件及缓冲液，如染色和脱色溶液与 SDS-PAGE 完全相同（5.1）。5×样品缓冲液配制时应含有 8mol/L 的尿素。

5.4 其他方法

5.4.1 放射性标记样品的检测[5,9,10,18,30]

凝胶电泳中使用放射性标记蛋白拓宽了蛋白质检测的局限性。可以通过放射自显影（将凝胶在 X 光片上曝光），或将凝胶切碎进行液闪计数，检测样品的放射性。

尽管切碎凝胶分辨率较低，然而却是一种量化的检测方法。凝胶可以用刀片切割，但现在已有商品化的凝胶切割器（Bio-Rad，Hofer），为了得到理想的液闪计数效果，应首先将蛋白质从凝胶中洗脱下来，也有一种简单的用双氧水溶解凝胶碎片的方法[9]。

放射自显影可以将 X 光片直接对凝胶曝光（凝胶用塑料纸密封）或在 X 光片后置一个增感屏来显影，这样可以提高放射自显影效果达 10 倍以上（称为间接自显影）。使用荧光显影的方法检测 ^{14}C、^{32}P、^{35}S 其敏感度约 15 倍，最常用的方法是将凝胶浸于荧光素如 ENHANCE（New England Nuclear）。如果检测 H^3，则必须使用荧光显影[5,9,10,18,30]。

5.4.2 分子量的测定[9,22]

由于蛋白质的迁移率与分子量成比例关系，因而可以用 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量。通过已知蛋白质的分子量绘制出标准曲线，未知蛋白质的分子量则可由标准曲线上查出。

5.4.2.1 操作步骤

1）电泳、染色结束后，测量蛋白质及示踪染料的迁移距离。蛋白质的迁移距离是指从分离胶的起始位到蛋白质条带

的前缘；

2）计算 R_f 值：

R_f = 蛋白质的迁移距离/示踪染料的迁移距离；

3）以已知蛋白质分子量的常用对数值为纵坐标，R_f 为横坐标绘图，位于凝胶中间的区域便可得到一条直线（图 5.12）；

4）通过测定未知蛋白质的 R_f 值，便可在标准曲线上读出它的分子量。

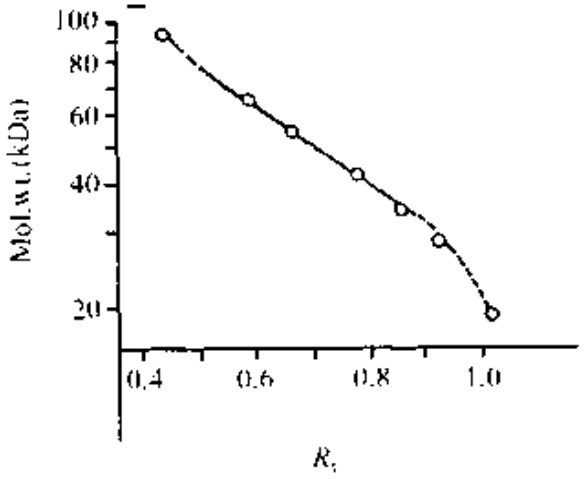


图 5.12　蛋白质分子量半对数值与相对迁移率作图（引自文献[22]）

5.4.2.2　注意事项[9,22]

1）R_f 值的计算应以在同一块薄片胶上分离的蛋白质结果得出。这样可以消除因丙烯酰胺的浓度和电泳条件的变化所引起的误差。

2）如认为分子量的测定可以完全依赖 SDS-PAGE 则是一种误导，因为一些蛋白质的迁移是不规则的

3）要做到非常严谨的测定蛋白质分子量，我们认为至少应在两个不同的丙烯酰胺凝胶浓度下进行电泳。

4）对于每一块凝胶都必须绘制一个新的标准曲线。

5）现在已有商品化的蛋白质分子量标准。在附录 2 中列出了一些已知蛋白质的分子量和它们的等电点。

6）由于染料与分子量标准蛋白质结合后会增加它们的分子量，所以在染色前应对其进行准确的校正。

7）可以干胶后再进行 R_f 值的计算。值得注意的是，干胶后引起蛋白质带变宽，尤其是厚胶难以准确对蛋白质和溶剂前沿定位。

5.4.3 蛋白质定量

蛋白质混合物中单个蛋白质的定量通常是将染色后凝胶的蛋白质条带在分光光度计上进行扫描，然后对峰面积积分。峰值的积分通常是用自动光密度计完成或将描记的峰从纸上剪下并称重。仅在限定浓度范围内，蛋白质条带的吸光度才与蛋白质的量成比例。由于蛋白质对不同染料的亲和力不同，所以在可能的条件下，对于不同蛋白质峰值的比较应基于绝对量化的标准曲线。Smith（1984）提出了一些光密度扫描分析的建议[24]。

蛋白质的定量可能需要从染色凝胶条带上将染料洗脱下来。也有从聚丙烯酰胺凝胶上收集考马斯亮蓝 R-250 的简单办法[2,34]。必须注意的是，为了对蛋白质准确的定量需要做一条蛋白的标准曲线，因为不同蛋白质与染料结合有差异。

5.4.3.1 操作步骤

1）用刀片从凝胶上切下蛋白质条带；

2）将凝胶置于一个玻璃试管内，加入 1ml 含 3% SDS 的 50%的异丙醇，用石蜡膜封口；

3）在 37℃水浴中静置 24h；

4）去除液体，在 595nm 处测定光密度。

5.4.4 电泳后蛋白质的洗脱

从丙烯酰胺凝胶中提取蛋白质可以采用被动扩散或电洗脱的方法。被动扩散法较为简单[3]，包括：用刀片将凝胶条切成碎片；在适宜的缓冲液中孵育不同的时间（一般为15min）；然后进行离心，收集上清；再加入稍多的缓冲液，重复抽提一次。采用电洗脱则会得到更高的产率，有一种较简单的电洗脱方法被称为逆向电流法，主要适用于管状凝胶[16]，也可用于垂直板电泳胶[27]。电洗脱设备已有国产和进口的商品可供选择。

SDS-PAGE后于原位或将蛋白质从凝胶条上洗脱下来后重组酶的活性都有相关报道（参见6.3.2）。有时应用变性作用低的去垢剂来取代SDS（如非离子型或两性离子去垢剂，参见1.4），成功的复性主要取决于盐、甘油、还原剂、辅助因子、或复性缓冲液中底物的浓度[19]。

参 考 文 献

[1] Allen, R.C., C.A Saravis and H.R. Maurer. 1984. Gel Electrophoeesis and Isoelectric Focusing of Proteins: Selected Techniques. Berlin: Walter de Gruyter.

[2] Ball, E.H. 1986. Quantitation of Proteins by Elution of Coomassie Brillant Blue R from Stained Bands after Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Anual. Biochem., 155: 23~27.

[3] Bhown, A.S. and J.C Bennett. 1983. High-Senstity Sequence Analysis of Protein Recovered From Sodium Dodecyl Sulfate Gel. Meth. Enzymol., 91: 450~455.

[4] Blackshear, P.J. 1984. System for Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Meth. Enzymol., 104: 237~255.

[5] Bonner, W.M. 1984. Fluorography for the Detection of Radioactivity in Gels. Meth. Enzymol., 104: 460~466.

[6] Dion, A.S. and A.A. Pomenti. 1983 Ammoniacal Silver Staining of Proteins: Mechanism of Glutaraldehyde Enhancement. Anal. Biochem., 129: 490~496.

[7] Giulian, G.G., R.L. Moss and M.Greaser. 1983. Improved Methodology for Analysis and Quantition of Proteins on One-dimensional Silver-Stained Slab Gels. Anal. Biochem., 129: 277~287.

[8] Gooderham, K. 1984. In J.M. Walker, ed. Methods in MolecularBiology. Volume 1:Proteins. Clifton, New Jersey: Humana Press, 113~118.

[9] Hames, B. D and D. Rickwood, eds. 1981. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. Oxford and Washington, D.C.: IRL Press.

[10] Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor.

[11] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227: 680~685.

[12] Marshall, Thomas and Katherine M. Williams. 1984. Artifacts Associated with 2-Mercaptoethanol upon High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis. Anal. Biochem., 139: 502~505.

[13] M. Windholz, Ed. 1983. Merck Index, The 10th Edition. Rahway, NJ: Merck and Co. Inc.

[14] Merril, C.R., D. Goldman and M.L. Van Keuren. 1984. Gel Protein Stains: Sliver Stain. Meth Enzymol., 104: 441~446.

[15] Ohsawa, K. and N. Ebata. 1983. Sliver Stain for Detecting 10-Femtogram Quantities of Protein after Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Anal. Biochem., 135: 409~415.

[16] Otto, M. and M. Snejdarkova. 1981. A Simple and Rapid Method for the Quantitative Isolation of Protein from Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem., 111: 111~114.

[17] Perret, B.A., R. Fleix, M. Furlan and A. Beck. 1983. Sliver Staining of High Molecular Weight Proteins on Large-Pore Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem., 131: 46~50.

[18] Roberts, P.L. 1985. Comparison of Fluorographic Methods for Detecting Radioactivity in Polyacrylamide Gels on Nitrocellulose Filters. Anal. Biochem., 147: 521~524.

[19] Dunn, M.J. ed. 1986. Gel Electrophoresis of Proteins. Bristol, England: IOP Publish Ltd.

[20] Schleif, R.F. and P.C. Wensink. 1981. Practical Methods in Molecular Biology. New York: Springer-Verlag.

[21] Scopes, R.K. 1982. Protein Purification: Principle and Practice. New York: Springer-Verlag.

[22] Creighton, T.E. ed. 1989. Protein Structure: A practical approach. Oxford: IRL Press.

[23] Hames, B.D. and D. Rickwood, eds. 1981. Gel Electrophoresis of Protein: A

Practical Approach. Oxford and Washington, D.C.; IRL Press.

[24] Walker, J.M. ed. 1984. Methods in Molecular biology. Volumel; Proteins. Clifton, New Jersey; Humana Press.

[25] Smith, L., R. Cronie and Stainsby. 1988. Seeing Gel Wells Well. Anal. biochem., 169; 370 - 371.

[26] Spanos, A. and U.Huebscher. 1983. Recovery of Functional Proteins in sodium dodecyl sulfate Gels. Meth. Enzymol., 91; 263 - 277.

[27] Stralfors, P. and P.Belfrage. 1983 Electrophoretic Elution of Proteins from Polyacrylamide Gel Slices. Anal. Biochem., 128; 7 - 10.

[28] Swank, R.T. and K.D. Munkres. 1971 Molecular Weight Analysis of Oligopeptides by Electrophoresis in Polyacrylamide Gel with Sodium Dodecyl Sulfate. Anal. Biochem., 39; 462 - 477.

[29] Hames, B.D and D.Rickwood, eds. 1981. Gel Electrophoresis of Proteins; a Practical Approach. Oxford and Washington.D. C.; IRL Press.

[30] Walker, J.M. ed. 1984. Methods in Molecular Biology. Volume 1; Proteins. Clifton, New Jersey; Humana Press.

[31] Weber, K., J.R. Pringle and M. Osborn. 1971. Measurement of Molecular Weights by electrophoresis on SDS-Acrylamide Gel Meth. Enzymol., 26; 3 - 27.

[32] Wedrychowski, A., R. Olinski and L.s.Hnilica. 1986. Modified Method of Sliver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem., 159; 323 - 328.

[33] Wilson, C.M. 1983. Staining of Proteins on Gels; Comparsion of Dyes and Procedures. Meth. Enzymol , 91; 236 - 246

[34] Wong, P , A. Barbeau and A.D. Roses. 1985. A Method to quantitate Coomassie Blue-Stained Proteins in Cylindrical Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem., 150; 288 - 293.

[35] Wray, W., T. Boulikas, V.P. Wray and R. Hancock. 1981. Sliver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem., 118; 197 - 203.

刘耀波

第六章　非变性条件下的凝胶电泳

6.1　引　　言

非变性凝胶电泳，也称为天然凝胶电泳。在凝胶中蛋白质的分离取决于它所带电荷及分子大小。按丙烯酰胺凝胶孔径大小去筛分不同尺寸蛋白质的同时，在分离胶酸性 pH 条件下高电荷的蛋白质的泳动速度会更快。这种方法可以区分仅有一个电荷单位差别的分子。与 SDS-PAGE 电泳相比，非变性凝胶大大降低了蛋白质变性发生的机率。

注意实验中一些细微的变化对非变性凝胶电泳的影响。

1）凝胶的孔隙度：凝胶中丙烯酰胺浓度改变范围在 5%～10%之间。丙烯酰胺与双丙烯酰胺的比例可从 20∶1 到 50∶1。这样可起到不同的筛分效应。

2）电荷：在非变性凝胶电泳中采用的 pH 通常为 8.8，因而多数蛋白质带负电荷。但电泳也可在微酸的环境下进行，这时需将阴极和阳极倒置。电泳后为了使目的蛋白质复性，需要在不影响生物活性的 pH 范围内进行电泳[1]。

3）离子强度：离子强度在电泳中异常重要。如果离子强度过高，电泳时会过度发热；反之，若离子强度太低，就有可能出现非特异蛋白质凝聚。通常离子强度使用范围在 10～100mmol/L。

4）温度：所有的电泳步骤都应在 0℃～4℃条件下进行。这样既可以保持蛋白质的活性，又可以降低蛋白质的水解作用。

6.2 不连续非变性凝胶电泳

非变性凝胶电泳通常是在高 pH（8.8）缓冲液条件下进行。这时，多数蛋白质带负电荷，并向阳极迁移。

6.2.1 设　　备

1）Bio-Rad Min-Protean II 凝胶电泳槽
2）电源
3）微量注射器或微量加样器
4）染色和脱色用的小容器

6.2.2 制　　胶

6.2.2.1 试　　剂

1）丙烯酰胺
2）双丙烯酰胺
3）Tris 碱
4）盐酸
5）过硫酸铵
6）TEMED
7）甘氨酸
8）甘油
9）溴酚蓝
10）考马斯亮蓝 R-250
11）甲醇
12）冰醋酸

6.2.2.2 工作溶液

（1）溶液 A（丙烯酰胺储存液），100ml
30%丙烯酰胺，0.8%双丙烯酰胺
注意：未聚合的丙烯酰胺是一种皮肤刺激物和神经毒素。操作时必须戴

手套

30g 丙烯酰胺

0.8g 双丙烯酰胺

加蒸馏水至 100ml，搅拌至完全溶解。在通风柜中操作，直至丙烯酰胺粉全部溶解，用石蜡膜封口，以保持溶液状态。

(2) 溶液 B（4×分离缓冲液），100ml

5mol/L Tris-HCl（pH8.8）

18.2g Tris 溶于 40ml 蒸馏水中；

加入盐酸至 pH8.8；

加蒸馏水至 100ml。

(3) 溶液 C（4×堆积胶缓冲液），100ml

0.5mol/L Tris（pH6.8）

6.0g Tris 溶于 40ml 蒸馏水；

加盐酸至 pH 为 6.8；

加蒸馏水至 100ml。

(4) 10%的过硫酸铵，5ml

0.5g 过硫酸铵；

5ml 蒸馏水。

(5) 电泳缓冲液，1L

3.0g Tris 25mmol/L；

14.4g 甘氨酸 192mmol/L；

加蒸馏水至 1L（终 pH 为 8.8）。

(6) 5×样品缓冲液，10ml

3.1ml 1mol/L Tris-HCl（pH6.8）312.5mmol/L；

5ml 甘油 50%；

0.5ml 1%溴酚蓝 0.05%；

1.4ml 蒸馏水。

6.2.2.3 工作溶液用量

（1）制备不同厚度电泳凝胶所需的溶液体积

制备两块 6cm×8cm 的凝胶

凝胶厚度	分离胶	堆积胶
0.5mm	5.6ml	1.4ml
0.75mm	8.4ml	2.1ml
1.0mm	11.2ml	2.8ml
1.5mm	16.8ml	4.2ml

配制量应比实际用量稍多些。

（2）X％分离胶的计算

A 液	X/3ml
B 液	2.5ml
蒸馏水	（7.5－X/3）ml
10％过硫酸铵	50μl
TEMED	5μl（如果 X＜8％，取 10μl）
总量	10ml

6.2.2.4 制备分离胶

举例：

制备两块 8％的分离胶（6cm×8cm×0.75mm），需配 10ml。

4.8ml	蒸馏水
2.7ml	A 液
2.5ml	B 液
50μl	10％过硫酸铵
5μl	TEMED

操作步骤如下：

1）按操作指南装配好灌胶用的模具；

2）将 A 液、B 液和水在小的三角瓶或试管中混合。（由于丙

烯酰胺具有神经毒性，应戴手套操作；

3）在温和搅拌下，加入过硫酸铵，TEMED混匀。由于这一步中发生聚合，动作要迅速；

4）将上述胶液用滴管移入凝胶模具中，见图6.1；

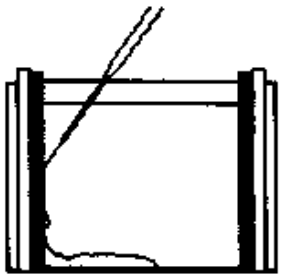


图6.1 用滴管将分离胶溶液加入凝胶模具

5）加完分离胶后，立即轻轻在其顶部覆盖1～5mm的水层；

6）静置30～60min，待凝胶聚合；

当凝胶聚合后，在分离胶和水层之间将出现一个明显的界面，这时将凝胶稍微倾斜，判断凝胶是否聚合。

6.2.2.5 注　　意

1）在分离碱性蛋白质时，要利用低pH凝胶系统，并使用以下缓冲液体系[2]（参见5.1.9）：

分离胶：0.06mol/L KOH，0.376 mol/L 乙酸，pH4.3（7.7% T，2.67% C）

堆积胶：0.06mol/L KOH，0.063 mol/L 乙酸，pH6.8（3.125% T，25% C）

电泳缓冲液：0.14 mol/L β-丙氨酸，0.35 mol/L 的乙酸，pH4.5

2）用低pH凝胶时，将正负电极倒置。

3）对于低pH凝胶系统，样品缓冲液中以甲基绿为示踪剂（终浓度为0.002%）。

4）用核黄素代替过硫酸铵进行光聚合时，聚合反应残留化合物较少。但是，聚合反应可能不完全。在堆积胶中一般使用的核黄素的终浓度为0.0005%（储存液的浓度为0.004%）。把凝胶暴露于日光下，以及在白色或蓝色的荧光灯下时，聚合作用便会开始。

5）如果需要还原剂，可采用 1mmol/L DTT。

6.2.2.6 堆积胶的制备

举例：

两块 5%的堆积胶（6cm×8cm×0.75mm），需配 4ml

2.3ml	蒸馏水
0.67ml	A 液
1.0ml	C 液
30μl	10%过硫酸铵
5μl	TEMED

操作步骤如下：

1）除去覆盖在分离胶上的水层；

2）在小三角烧瓶或试管中，将 A 液，C 液和蒸馏水混合；

3）在温和搅拌下，加入过硫酸铵和 TEMED，混合均匀；

4）吸取堆积胶溶液加到分离胶之上，直至溶液到达前玻璃板的顶部。见图 6.2；

5）将梳子小心的插入到两块板之间，直至梳子齿底部到达前玻璃板的顶部，在梳子齿端避免留下气泡。见图 6.3 和图 6.4；

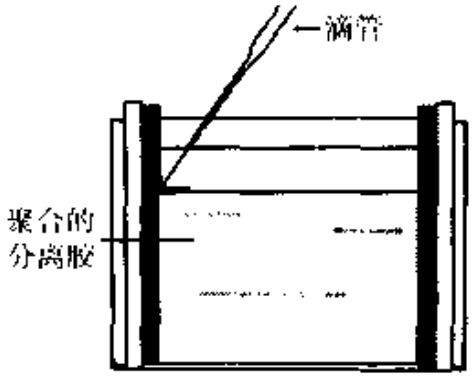


图 6.2 用滴管将堆积胶溶液加入凝胶模具

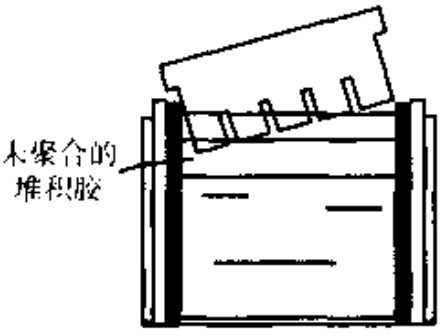


图 6.3 将上样孔梳子插入堆积胶内

6）放置 30min，堆积胶可聚合；

7）待堆积胶聚合后，小心的取出梳子，不要使加样孔裂缝；

8）将凝胶置入电泳槽中，并接好正负电极；

9）将电泳缓冲液加入内外电泳槽中，确保凝胶的上部和底部都浸在缓冲液中。

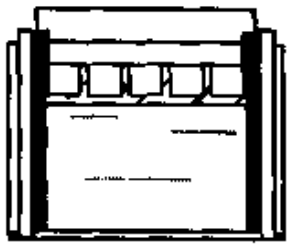


图 6.4　堆积胶聚合之前

6.2.3　样品制备

6.2.3.1　加样孔的样品容量（Mini-Gel 系统）

凝胶厚度	1 孔	5 孔	10 孔	15 孔
0.5mm	0.7ml	45μl	16μl	9μl
0.75mm	1.0ml	68μl	24μl	14μl
1.0mm	1.4ml	90μl	32μl	18μl
1.5mm	2.1ml	135μl	48μl	27μl

6.2.3.2　操作步骤

1）将蛋白质样品和 5× 样品缓冲液（20μl + 5μl）在 Eppendorf 管中混匀；

2）用微量注射器将样品加入加样孔中（图 6.5）；

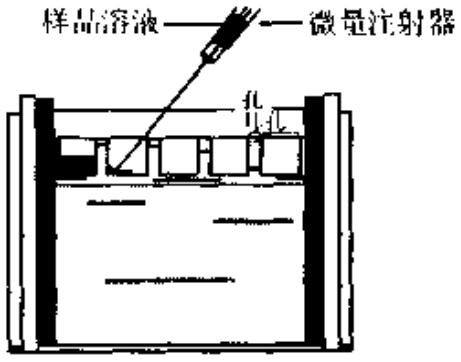


图 6.5　用微量注射器将蛋白质样品加入上样孔

3）在加入不同的样品之前。用注射器抽吸少量的电泳缓冲液冲洗注射器，以避免样品间的相互污染。

6.2.3.3 注　　意

1）通常，每孔可上样 1～5μg 蛋白质，或 30μg 以上蛋白质复合物。
2）最好在空的泳道上加上缓冲液作为空白样品对照。
3）样品液在 10 000×g 离心 15min 之后再上样，以除去可能干扰电泳的不溶物。
4）样品中盐的浓度超过 0.1mmol/L，可使蛋白质电泳条带变形。

6.2.4 电　　泳

6.2.4.1 操作步骤

1）将电极插头与相应的电极相接，对于 pH8.8 的凝胶，电流应是流向阳极；
2）将电压调至 100～200V；
3）电泳至示踪染料的前沿迁移到距凝胶底部约 1～5mm 处；
4）关闭电源；
5）拔出电极插头；
6）取出电泳凝胶板，放在一个安全的地方，轻轻撬开凝胶两边的玻璃板。使胶粘在其中的一块板上；
7）注意：电泳中使用强电流非常危险。切记在关闭电源前，千万不要断开电极。如果所使用的电泳装置没有与外界完全隔离，一定要设置一个醒目的标志，以提示电泳正在进行中。

6.2.4.2 建　　议

1）恒压可使电泳中蛋白质迁移率保持恒定。
2）如果电流太大，电泳时大量产热可导致蛋白质变性；如

果电流太小，会延长电泳时间，使电泳条带弥散。使电压维持在 100～200V 范围内进行电泳较适宜。

6.2.5 凝胶染色

考马斯亮蓝染色在每条蛋白质电泳条带中可检测出 0.1μg 的蛋白质。要进一步提高灵敏度可采用银染方法。非变性凝胶考马斯亮蓝染色实例见图 6.6。对银染及考马斯亮蓝染色的详细介绍可参考第五章中有关章节。

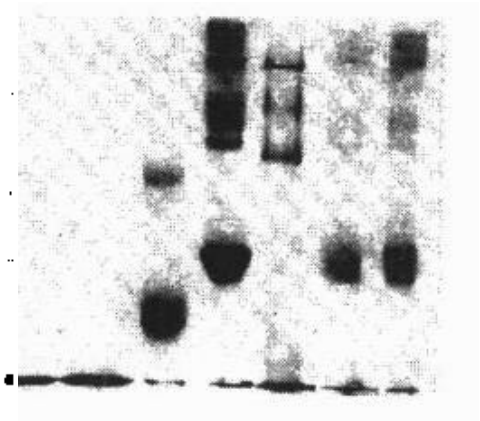


图 6.6 非变性电泳凝胶考马斯亮蓝染色。凝胶浓度为 6%，样品为 Sigma 公司非变性蛋白质分子量标准样品

(1) 考马斯亮蓝染液，1L

考马斯亮蓝 R-250	1.0g
甲醇	450ml
蒸馏水	450ml
冰醋酸	100ml

(2) 考马斯亮蓝凝胶脱色液，1L

甲醇	100ml
冰醋酸	100ml
蒸馏水	800ml

(3) 染色过程

1）戴手套，将凝胶转移到一个含有约 20ml 考马斯亮蓝染液的培养皿内；

2）在摇床上缓慢震荡，0.75mm 的胶需要 5～10min。1.5mm 的胶需要 10～20min；

3）去除染液；

4）加入约 50ml 脱色液，继续轻微震荡；

5）为了脱色完全，可更换脱色液数次，震荡过夜；可按第五章的方法进行干胶保存。

6.2.6 连续非变性凝胶电泳

由于无需用堆积胶的原因，连续性凝胶电泳往往比非连续性凝胶电泳要更简便一些。电泳梳子插入分离胶中即可。由于缺少堆积胶，蛋白质电泳条带会变宽，而且分辨率差。值得注意的是：为了获得清晰的蛋白质电泳带，在连续性凝胶电泳时，蛋白质缓冲液的离子强度要比凝胶缓冲液离子强度低 5～10 倍。而且蛋白质样品的上样量在加样孔内不得超过 2～3mm。连续性凝胶电泳所使用的缓冲液可与非连续性凝胶电泳相同[3]。

6.3 相关的方法

6.3.1 蛋白质分子量的测定

多数情况下，采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量，因为此法是按照蛋白质分子量大小进行分离的。在非变性凝胶电泳条件下测定蛋白质分子量，蛋白质样品必须在丙烯酰胺浓度变化的情况下进行电泳，梯度范围通常在 4%～12%。这样叠加的结果足以抵消蛋白质电荷的效应。

数据处理方法如下[4]：

用 R_f 值计算蛋白质迁移率，R_f 值 = 蛋白质迁移率/指示剂迁移距离。R_f 值对丙烯酰胺浓度的半对数值作图（图 6.7）绘出了特定的蛋白质分子量曲线的斜率。

在同一条件下，作已知分子量蛋白质电泳，从实验中得出与

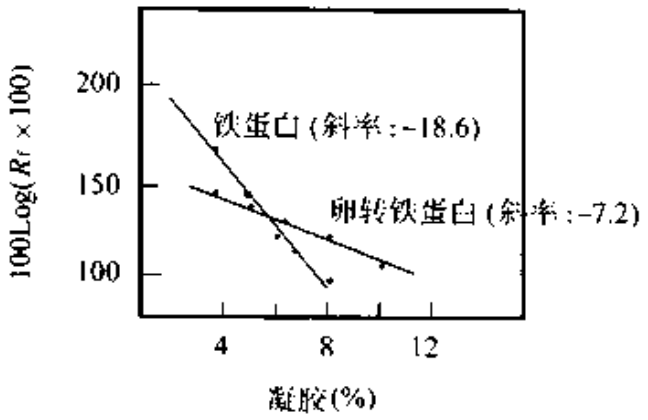


图 6.7　相对迁移率的对数值，100Log（R_f×100），对凝胶的丙烯酰胺浓度作图

分子量线性相关曲线的斜率（图 6.8）。未知的目的蛋白质分子量可以从已知分子量蛋白质标准曲线外推得出。

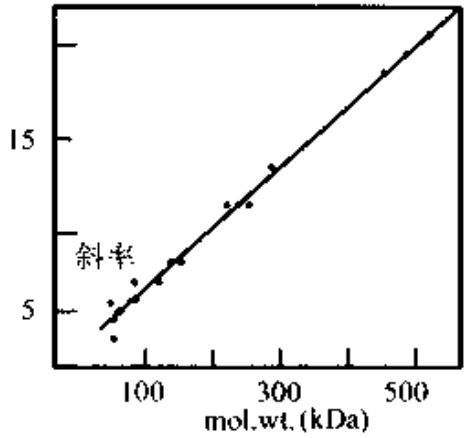


图 6.8　图 6.7 中 100log（100R_f）值对凝胶百分比浓度作图得出的斜率与蛋白质分子量的函数关系图。这些蛋白质包括：1. 胃蛋白酶，2. 卵蛋白酶，3.α-淀粉酶，4. 白蛋白，5. 转铁蛋白，6. 卵运铁蛋白，7. 己糖激酶，8. 乳糖脱氢酶，9. 酮糖-1-磷酸醛缩酶，10.β-淀粉酶，11. 烟酰胺脱氢酶，12.α-脲酶，13. 触酶，14. 黄嘌呤氧化酶，15. 脱铁铁蛋白，16. 脲酶，17. 核酮糖二磷酸羧化酶

6.3.2 电泳后酶活性的测定

聚丙烯酰胺凝胶电泳之后，无论是在胶内的或是从胶中洗脱下来的酶，都可以测定其活性。往往认为经过电泳之后各种蛋白质难以保持活性，然而许多蛋白质在电泳后仍显示其活性。

聚丙烯酰胺凝胶中许多酶类都已测定过。例如，关于脱氢酶类、转运酶类、水解酶类、聚合酶类和异构酶类等在凝胶中的活力测定方法，文献中都有详细记载[5]。

为了将蛋白质从凝胶介质中提取出来，首先要对凝胶中的蛋白质定位。用考马斯亮蓝或银染色可使蛋白质显示出来，但这些处理方法可使蛋白质发生改变或变性。采用荧光显示蛋白法可避免上述影响[6]。

在第五章中曾提到可采用被动扩散或电洗脱将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶中提取出来。用被动扩散法提取蛋白质，需要用刀片将凝胶中电泳带切下，尽量切碎，通过离心除去碎胶，蛋白质留在提取液中[7]。而电洗脱处理，如反向洗脱可以更好的提高产率[8]。

Rothe 和 Maurer（1986）报告了用凝胶电泳分离了 40 种蛋白质[9]，并鉴定了它们的活性。Hubby 和 Liewontin（1966）[10]报道了凝胶中的脂酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶、碱性磷酸酶、α-甘油磷酸脱氢酶和亮氨酸氨基肽酶的酶活性分析结果。类似的报道还有 Prakash 等（1969）[11]对 α-淀粉酶和乙醛氧化酶的测定结果。

参 考 文 献

[1] Hames B.D. and D. Rickwood eds. 1981. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. London: IRL Press.

[2] Reisfeld, R.A., V.J. Lewis and D.E. Williams. 1962. Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels. Nature, 195: 281.

[3] Mclellan, T. 1982. Electrophoresis Buffers for Polyacrylamide Gels at Various pH. Anal. Biochem., 126: 94～99.

[4] Hedrick, J.L. and A.J. Smith. 1968. Size and Charge Isomer Separation and Estimation of Molecular Weights of Proteins by Disc Gel Electrophoresis Arch. Biochem. Biophys., 126: 155~164.

[5] Gabriel, O. 1971. Locating Enzymes on Gels Meth. Enzymol., 22: 578~604.

[6] Leibowitz, M.J. and R.W. Yong. 1984. Visualization and Elution of Unstained Proteins from Polyacrylamide Gels Anal. Biochem., 137: 161~163.

[7] Bhown, A.S. and J.C. Bennett. 1983. High-Sensitivity Sequence Analysis of Proteins Recovered from Sodium Dodecyl Sulfate Gels. Meth. Enzymol., 91: 450~455.

[8] Otto, M. and M. Snejdarkova. 1981 A simple and Rapid Method for the Quantitative Isolation of Proteins from Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem., 111: 111~114.

[9] Dunn, M.J. ed. 1986. Gel Electrophoresis of Proteins. Bristol: IOP Publish Limited.

[10] Hubby, J.L. and R.C. Lewontin. 1966. A molecular Approach to the Study of Genetic Heterozygosity in Natural Populations. I. The Number of Alleles at Different Loci in *Drosophila pseudoobscura*. Genetic, 54: 577~594.

[11] Prakash, S., R.C. Lewontin and J.L. Hubby. 1969. A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations. Ⅳ. Patterns of Genic Variation in Central, Marginal and Isolated Populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetic*, 61: 841~858.

刘耀波　汪家政

第七章　等电聚焦和双向凝胶电泳

7.1　等电聚焦

7.1.1　原　　理

等电聚焦凝胶电泳（isoelectri focusing gel electrophoresis，IEF）是依据蛋白质分子的净电荷或等电点进行分离的技术。等电聚焦中，蛋白质分子在含有载体两性电解质形成的一个连续而稳定的线性 pH 梯度中电泳。载体两性电解质是脂肪族多氨基多羧酸，可在电场中形成正极为酸性，负极为碱性的连续的 pH 梯度。蛋白质分子在偏离其等电点的 pH 条件下带有电荷，因此可以在电场中移动；当蛋白质迁移至其等电点位置时，其净电荷数为零，在电场中不再移动，据此将蛋白质分离。O' Farrell[8]证实，将等电聚焦后的胶条放在 SDS-PAGE 上依据分子量进行第二方向电泳时可获得更好的分辨率。双向电泳使分离和研究复杂蛋白质混合样品成为可能。

等电聚焦中，只有在凝胶两端给予高电压时，才能获得较好的蛋白质条带分辨率。而高电压的维持需要非常有效的凝胶冷却系统（否则会导致烧胶），即凝胶同其周围液体之间的热传递效率要高。由于平板胶热传递能力高，并可方便地同时比较多种蛋白质样品，本章只着重讨论平板胶等电聚焦电泳（而非传统的管状凝胶）。

由于等电聚焦对蛋白质的电荷差异非常敏感，若要好的重复性，制备蛋白质样品时一定要小心避免任何对蛋白质化学组成和结构的修饰。另外，蛋白质-脂类、蛋白质-蛋白质相互作用可引起电荷改变，进而导致等电点迁移或纹理现象。除非特殊需要研

究蛋白质-蛋白质相互作用或必须保持蛋白质的生物学功能，等电聚焦通常在含有尿素的变性凝胶系统中进行。使用非离子去垢剂可能提高分辨率。

所需时间：9h。

灌胶	90min
等电聚焦	3h
第二向电泳	
凝胶平衡	30min
上样	15min
电泳	45min
凝胶固定	2～3h
考马斯亮蓝染色	30min

7.1.2 主要仪器

1）Bio-Rad 微型蛋白质电泳系统（Mini-Protean Ⅱ Gel System）
2）电源
3）注射器
4）固定和染色用容器

7.1.3 灌制等电聚焦凝胶

7.1.3.1 试　　剂

1）丙烯酰胺
2）双-丙烯酰胺
3）载体两性电解质
4）尿素
5）过硫酸铵
6）TEMED
7）Triton X-100
8）2-巯基乙醇

9）溴酚蓝

10）H_3PO_4

11）NaOH

12）KCl

13）三氯乙酸（TCA）

14）考马斯亮蓝 R-250

15）甲醇

16）乙酸

7.1.3.2 储 存 液

1）溶液 A：30%（w/v）丙烯酰胺，1%（w/v）双-丙烯酰胺

2）20% Triton X-100

3）10% TCA

4）1% TCA

5）1%溴酚蓝

6）考马斯亮蓝染色液

7）考马斯亮蓝脱色液

7.1.3.3 载体两性电解质的选择

载体两性电解质（ampholyte）是一些具有相近等电点的，分子量为 600～900Da 的多氨基多羟基两性化合物的混合物[15]。下表为配置不同 pH 范围等电聚焦凝胶的载体两性电解质配方[5]。

表 7.1 不同 pH 范围等电聚焦凝胶的载体两性电解质配方

pH 范围	载体两性电解质 pH 范围	凝胶中的百分比%
pH 3.5 - 10	pH 3.5 - 10	2.4%
pH 4 - 6	pH 3.5 - 10	0.4%
	pH 4 - 6	2%

续表

pH 范围	载体两性电解质 pH 范围	凝胶中的百分比%
pH 6～9	pH 3.5～10	0.4%
	pH 6 ～8	1%
	pH 7 ～9	1%
pH 9～11	pH 3.5～10	0.4%
	pH 9 ～11	2%

7.1.3.4 灌　　胶

下例为灌制 8cm×7cm×0.75mm pH 4～6 变性等电聚焦凝胶的配方。其他 pH 范围等电聚焦凝胶参考上表配置。

H_2O	5.4ml
溶液 A	2.0ml
载体两性电解质溶液 pH3.5～10	48μl
载体两性电解质溶液 pH4～6	240μl
超纯尿素	6.0g
10%过硫酸铵	25μl
TEMED	20μl

按下列步骤灌胶：

1）组装灌胶器；

2）将尿素、水、溶液 A 和载体两性电解质溶液混匀，避免剧烈摇动，轻微加热尿素溶解更快（戴手套，丙烯酰胺有毒!）；

3）加入过硫酸铵和 TEMED，轻轻混匀（此时已开始聚合，操作要迅速）；

4）将上述混匀溶液倒入灌胶器（沿垫片缓慢倒入，避免气泡产生）；

5）插入梳子，将梳子浸入胶内（小心梳齿处不要有气泡）；

6）聚合约 1h；

7）聚合完成后，小心拔去梳子；

8）将凝胶同冷却装置连接后插入电泳池。蛋白质样品上样前最好用阳极电极液注入上槽中确定是否有渗漏，灌胶和组装电泳装置前在密封垫圈上涂抹硅油胶可获得良好的密封效果。

7.1.3.5 注　　意

1）冲去上样孔底部未聚合的丙烯酰胺，否则电泳过程中会发生聚合[5]；

2）现已有商品化的等电聚焦凝胶，但只限于水平平板电泳系统（如 Pharmmacia-LKB，Hoefer）。

7.1.4 样品制备和上样[20]

7.1.4.1 每孔容量（Bio-Rad Mini-Gel system）

表 7.2 样品孔容量

胶厚（mm）	1 孔（ml）	5 孔（μl）	10 孔（μl）	15 孔（μl）
0.5	0.7	45	16	9
0.75	1.0	68	24	14
1.0	1.4	90	32	18
1.5	2.1	125	48	27

7.1.4.2 变性凝胶上样缓冲液（2×）

2.4g	尿素 8mol/L
20μl	载体两性电解质，pH 3.5～10
100μl	载体两性电解质，pH 4～6
500μl	20% Triton X-100（2%）
50μl	2-巯基乙醇（1%）
1.7ml	双蒸水
200μl	1%溴酚蓝

适用于 pH4～6 梯度凝胶。

可分装成每份 0.5ml 包装储存于 -20℃[12]。

每孔用 1/4 体积样品缓冲液漂洗。

7.1.4.3 操作步骤

1) 将蛋白质样品与等体积的 2× 上样缓冲液混合，10000×g离心 5min 以去除蛋白质沉淀[21]；

2) 用微量注射器将蛋白质样品加入上样孔底部。

7.1.4.4 注　　意

1) 对考马斯亮蓝染色来说，每个泳道 10～30μg 的蛋白混合粗提物或 5～10μg 单--蛋白组分是较合理的上样浓度。

2) 若样品不能进入溶液，可超声处理，但应保持温度在 30℃以下。

7.1.5 等电聚焦电泳

7.1.5.1 电 泳 液[9]

1) 上槽中加入阴极电泳液（20mmol/L 氢氧化钠）；

2) 下槽中加入阳极电泳液（10mmol/L 磷酸）。

7.1.5.2 注意事项

1) 阳极电泳液应由 1mol/L 磷酸储存液新鲜配制；阴极电泳液应由 1mol/L 氢氧化钠储存液新鲜配制[12]；

2) 应在室温下操作以防止尿素沉淀。

7.1.5.3 等电聚焦电泳条件[20]

1) 接好电极；

2) 恒压 150V 电泳 30min；

3) 恒压 200V 电泳 2.5h。开始时电流应为 10mA 左右，在聚焦过程中电流有所下降。电泳内室温度在电泳过程中

将升至 40℃～50℃。

7.1.6 聚焦后处理

7.1.6.1 测定 pH 梯度

1）将一凝胶条切成 0.5cm 或 1cm 小片；

2）将每小片凝胶在 1ml 10mM KCl 中浸泡 30min；

3）测读此 KCl 溶液 pH 值。

7.1.6.2 凝胶的固定[20]

1）将凝胶于 10% TCA 中浸泡 10min；

2）换成 1% TCA 溶液继续浸泡至少 2h 以去除载体两性电解质。浸泡过夜可更好地降低考马斯亮蓝对载体两性电解质的染色。

图 7.1 等电聚焦凝胶电泳结果

7.1.6.3 凝胶的染色

1）将凝胶于考马斯亮蓝染色液中染色 10min，并轻轻摇动；

2）倒掉染色液并更换为脱色液。更换脱色液数次，脱色过夜；

3）如第五章方法干燥凝胶。图 7.1 显示一典型的等电聚焦电泳结果。

7.1.7 天然等电聚焦电泳的修正方案

若进行天然等电聚焦电泳，需在上述步骤基础上做如下修正：

7.1.7.1 灌　　胶（pH4～6）

天然等电聚焦凝胶，5%T，3.3%C（两块 8cm × 7cm × 0.75mm 微型凝胶），12ml

H_2O	9.7ml
溶液 A	2.0ml
载体两性电解质溶液 pH3.5～10	48μl
载体两性电解质溶液 pH4～6	240μl
10%过硫酸铵	50μl
TEMED	20μl

7.1.7.2 样品处理及上样

天然凝胶上样缓冲液（2×），5ml
3ml 甘油
200μl 载体两性电解质（同制胶成分一致）
1.8ml H_2O

1）将样品同等体积的上样缓冲液混匀，上样前 10 000×g 离心 5min；
2）将样品加入样品孔。

7.1.7.3 等电聚焦条件[20]—在室温下进行

1）连接电极；
2）恒压下先 200V 电泳 1.5h，再 400V 电泳 1.5h。

7.1.8 讨　　论

7.1.8.1 问题释疑[1]

1）若产生模糊条带则证明聚焦不完全，这可能由于电泳中的问题或大分子蛋白质限制了其在凝胶中的迁移能力。若聚焦时间过长或过短，条带的分辨率下降。增加电压梯度可使带形更加锐利。高分子量蛋白质在琼脂糖凝胶中可聚焦更好。
2）产生歪斜的条带通常缘于不正确的 pH 梯度。检查电极是否洁净，是否同凝胶连接良好，同时应注意凝胶边缘

的异常效应。

3）蛋白带的纹理现象是等电聚焦经常遇到的问题，可能有下列几种原因：

- 蛋白质聚集或沉淀（尤其在等电点附近），或上样量过多。8mol/L 尿素通常用来防止蛋白质聚集，去垢剂如 Triton X-100 和 NP-40 常用来防止膜蛋白的聚集。上样前一定要离心以除去不溶颗粒。
- 样品中残存核酸。可采用多种方法去除核酸污染，如酸抽提、盐沉淀、核酸酶消化等。
- 蛋白质修饰。非超级纯的尿素中的异氰酸盐污染物可导致蛋白质的氨甲酰化，预电泳可去除异氰酸盐。蛋白质样品处理或储存不当时会发生包括 Cys 残基氧化，Asn 或 Gln 残基去氨基化等修饰过程。

4）波浪形条带常由于样品中盐浓度过高。有时载体两性电解质或电极液不纯或电极不洁净也会产生波浪条带。

5）电极同凝胶连接不平行，配置凝胶时试剂不纯，载体两性电解质浓度过低均可导致不均等的 pH 梯度。若凝胶碱性部分 pH 梯度丢失，其可能的原因是阳极漂移。解决的方法是补充 pH9～11 的载体两性电解质或进行非平衡 pH 梯度电泳。

6）染色时高背景的产生可能由于固定后载体两性电解质仍残留于凝胶中，增加 1%TCA 固定的时间。

7）蛋白条带丢失或过淡可能由于蛋白质分子量较低（<10kDa）或蛋白质在固定中未被变性。增加 TCA 浓度或使用戊二醛固定。

8）复杂蛋白质混合物等电聚焦后可产生相互重叠的斑点，改变等电聚焦凝胶 pH 范围可解决此问题。进一步的蛋白质纯化或免疫沉淀处理可避免重叠斑点产生。

7.1.8.2 注　　意

1）等电聚焦后可用一根染色的细线（直径 0.1mm）标出染料前沿的位置。

2）不同品牌的载体两性电解质性质上有细微的差别，使用不同来源的载体两性电解质凝胶时蛋白质分离式样略有差异。若要获得最好的重复性请不要更换载体两性电解质的品牌。

3）通常，窄范围的 pH 梯度可提高分辨率，但需要时间也长；pH 梯度范围为 2 是较好的选择[6]。

4）由于电源和凝胶冷却系统的限制，最长的凝胶长度为 8～10cm。实际上，分别电泳几块不同 pH 梯度的凝胶比只电泳一块较长凝胶效果更好[1]。

5）当等电聚焦电泳时间很长时（>3000V·h），由于载体两性电解质不稳定造成的阴极漂移将成为严重问题。阴极漂移会破坏 pH 梯度，尤其是 pH8 以上的梯度。为克服此问题，O'Farrell 等[9]开发了一种较短时间（1600V·h）完成等电聚焦电泳的技术，即非平衡 pH 梯度电泳（nonequilibrium pH gradient electrophoresis，NEPHGE），NEPHGE 可在高 pH 范围内聚焦蛋白质，但该方法不能用来测定蛋白质等电点。

6）尿素可促进蛋白质溶解，并消除蛋白质-蛋白质及蛋白质-脂类相互作用，可增加聚焦速度和提高分辨率，同时抑制阴极漂移。但要注意变性蛋白质的等电点可能同天然蛋白有所差异。

7）若蛋白溶液中含 SDS，可加入尿素至终浓度 8M。在高浓度的尿素下，SDS 和同蛋白质的相互作用极小。

8）在变性液中常加入 2% NP-40 或 2% Triton X-100 以保证蛋白质（尤其是膜蛋白）的充分溶解[5,9]。有些作者推荐使用如 CHAPS 和 Zwittergent3-14 等两性离子去垢

剂。

9）超薄凝胶（50～500μm）比常用标准等电聚焦凝胶更有优势，因为高电场强度和更佳的冷却效果使聚焦速度更快，分辨率更高[1,5,13]。

10）Pharmacia 公司的固相等电聚焦凝胶在 pH4～7 范围内有极好的分辨率。

11）在聚丙烯酰胺等电聚焦凝胶中，高分子量蛋白质（>750kd)常表现异常的迁移行为，琼脂糖凝胶或琼脂糖-丙烯酰胺凝胶较适用于高分子量蛋白质[1,11]。

12）考马斯亮蓝染色中，TCA 固定后用含 0.25% SDS 的乙醇：醋酸：水（33∶10∶57）溶液洗涤凝胶 10～30min 可进一步改善染色效果。SDS 同载体两性电解质结合后可更好地去除载体两性电解质[5]。

7.2 固相 pH 梯度等电聚焦电泳

7.2.1 简　　介

固相 pH 梯度等电聚焦（immobilized pH gradients isoelectric focusing，IPGIEF）是 80 年代建立起来的一种新型等电聚焦技术。其所用的介质是一些具有弱酸或弱碱性质的丙烯酰胺衍生物，它们与丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺有相似的聚合行为。如 Pharmacia 公司的固定化电解质（immobiline)。

固定化电解质一端的双键可以在聚合中共价结合到聚丙烯酰胺介质中；其另一端的 R 基团为弱酸或弱碱，可在聚合物中形成弱酸或弱碱的缓冲体系。利用缓冲体系滴定终点附近一段 pH 范围就可形成近似线性的 pH 梯度。所以固相 pH 梯度与载体两性电解质 pH 梯度的区别在于前者的分子不是两性分子，在凝胶聚合时便形成 pH 梯度，不随环境电场条件的改变而改变；后者是两性分子，在电场中迁移到自己的等电点后才形成 pH 梯度。IPGIEF 比传统的 IEF 具有更高的分辨率，更大的上样量。其分辨率可达 0.001pH。是目前分辨率最高的电泳方法之一[16～18]。

7.2.2 仪　　器

Pharmacia 公司 IPG Phor 系统

7.2.3 制备等电聚焦凝胶

7.2.3.1 试　　剂

1）丙烯酰胺
2）双-丙烯酰胺
3）Immobiline II
4）过硫酸铵
5）TEMED

7.2.3.2 储 存 液

（1）丙烯酰胺单体贮液
溶解 14.55g 丙烯酰胺和 0.45g N，N′-双甲叉丙烯酰胺于 40ml 双蒸水中，溶解过滤后定容至 50ml，4℃可保存 2 周。

（2）Immobiline II
使用前将贮存于 4℃～8℃的 Immobiline II 溶液于室温下平衡半小时。

（3）固定化电解质的选择
固定化电解质可分成酸性和碱性固定化电解质，分别含有一个弱的羧基和氨基。商品化的固定化电解质有 6～7 种，但实验室已可合成不同 pK 值的丙烯酰胺衍生物 17 种[3]。利用不同 pK 固定化电解质的组合可配置不同 pH 范围的凝胶，甚至一个 pH 范围[23]及小于一个 pH 范围[16]的凝胶。现已经可利用计算机商业软件[2,4]，从 10 种不同 pK 的固定化电解质中选择缓冲离子和滴定剂，设计 pH2.5～12 任意宽窄范围的 pH 配方。现已有多种 pH 范围商品化的固相 pH 梯度凝胶出售。

7.2.3.3 灌　　胶

表 7.3 为配置 T＝5%，C＝3%凝胶配方[24]。凝胶溶液必须新鲜配制。通常将酸性固定化电解质作为重液，碱性固定化电解质作为轻液。

表 7.3　固相 pH 梯度凝胶配方

贮　　液	重液（混合腔）	轻液（贮液腔）
缓冲固定化电解质	? μl *	? μl *
滴定固定化电解质	? μl *	? μl *
丙烯酰胺单体贮液	1.25ml	1.25ml
甘油（87%）	2.1ml	—
双蒸水定容到	7.5ml	7.5ml

* 不同 pH 梯度范围加入的固定化电解质的量不同，参见表 7.4。

若要提高电泳速度，可加 100μl 载体两性电解质。

表 7.4　宽固相 pH 梯度配方

酸性溶液体积（μl）							碱性溶液体积（μl）					
0.2mol/L 固定化电解质 pK							0.2mol/L 固定化电解质 pK					
3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3	pH 范围	3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3
299	223	157	—	—	—	3.5～5.0	212	310	465	—	—	—
569	99	439	—	—	—	4.0～6.0	390	521	276	—	—	722
415	240	499	—	—	—	4.5～6.5	—	570	244	235	—	297
69	428	414	—	—	—	5.0～7.0	—	474	270	219	—	320
—	450	354	113	—	—	5.5～7.5	347	—	236	287	284	—
435	—	323	208	44	—	6.0～8.0	286	—	174	325	329	—
771	—	276	185	538	—	6.5～8.5	192	—	153	278	362	—
1349	—	—	272	372	845	7.0～9.0	484	—	—	232	189	546
668	—	—	445	226	348	7.5～9.5	207	—	—	925	139	346
399	—	—	364	355	94	8.0～10.0	91	—	—	329	366	289
587	110	450	—	—	—	4.0～7.0	302	738	151	269	—	876
702	254	416	133	346	—	5.0～8.0	175	123	131	345	346	—
779	—	402	93	364	90	6.0～9.0	241	—	161	449	237	225
542	—	—	378	351	—	7.0～10.0	90	—	—	324	350	280
588	254	235	117	170	—	4.0～8.0	—	554	360	142	334	288
830	582	218	138	795	122	5.0～9.0	—	249	263	212	292	230
941	—	273	243	260	282	6.0～10.0	100	—	333	361	239	326
829	235	232	22	250	221	4.0～9.0	147	424	360	296	71	663
563	463	298	273	227	127	5.0～10.0	21	59	34	420	310	273
1102	—	455	89	334	—	4.0～10.0	—	114	50	488	157	357

按下列步骤灌胶：

1）如图 7.2 组装灌胶器。灌胶前梯度混合器的腔间阀和流出管的夹子都应关闭；

2）将 7.5ml（视凝胶大小而定）轻液（碱性）注入梯度混合器的贮液腔。小心打开腔间阀，赶去腔间气泡，再关上腔间阀；

3）将同样体积的重液注入梯度混合器的混合腔。两腔中分别放入同样大小的搅拌子。在贮液腔放入补偿棒，此时两腔中液面应相平；

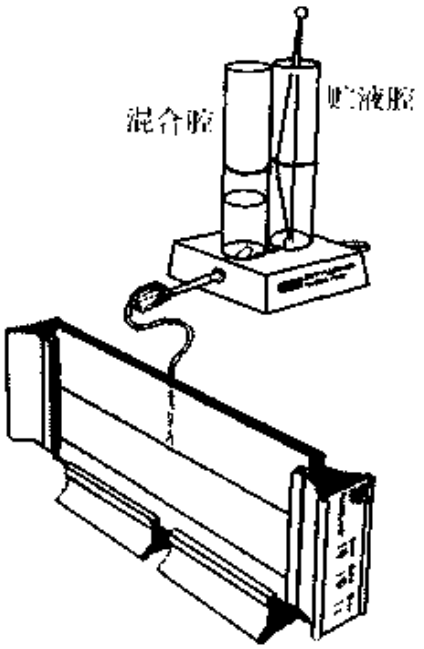


图 7.2 固相 pH 梯度灌胶器示意图

4）将梯度混合器置于磁力搅拌器上，将流出管插入灌胶模具中央。梯度混合器的出口与流出管末端高度应相差 5cm，磁力搅拌器转速为 200～500r/min；

5）两个腔中加入 TEMED，然后加入过硫酸铵。打开流出管的夹子，当酸液流到流出管的一半时，打开腔间阀。两腔液面同时下降，在混合腔混匀后缓缓注入垂直放置的模具中；

6）灌注完毕后，室温静置 5～20min（可用异丙醇封胶）于 50℃烘箱中聚合。灌胶后，立即洗净梯度混合器，以免堵塞腔间阀；

7）聚合约需 1h。完成后，取出凝胶，标上正、负极；

8）将凝胶称重后放入双蒸水中（6×10min 或 3×1h），室温下 60 次/分震摇以洗去催化剂和未聚合的单体；

9）用冷风吹胶至与洗胶前重量相差小于 1%。

7.2.4 样品制备和上样

固相 pH 梯度等电聚焦的样品处理方法同载体两性电解质等电聚焦的样品处理方法基本相同，而且要求比载体两性电解质等电聚焦的样品处理方法还要低。由于 pH 梯度在凝胶中已经固定，所以样品中的盐对 pH 梯度影响不大。

固相 pH 梯度等电聚焦通常为水平电泳，没有垂直电泳的加样孔。由于每个蛋白质被浓缩在其等电点位置，理论上将样品加在凝胶的任意位置均能得到相同结果。但实际操作中还是应避免将样品加在紧靠两极的位置或靠近等电点的位置。

7.2.5 等电聚焦电泳

以 Pharmacia 公司 IPG-Phor 系统为例：

1）打开循环水浴，设置冷却温度为 10℃；

2）将固相 pH 梯度凝胶铺在冷却板上，在凝胶和冷却板之间可涂以液体石蜡或煤油以避免气泡产生，使二者之间接触良好；

3）参见下表选择合适的电极液[16]，以电极液润湿滤纸电极条，分别放置于凝胶的酸、碱侧；

表 7.5 电极液配方

阳极液	阴极液
双蒸水①	双蒸水①
0.3%～1%载体两性电解质②	0.3%～1%载体两性电解质②
10m mol/L 谷氨酸	10m mol/L 赖氨酸

①适合宽范围 pH 梯度凝胶和高盐浓度的样品；②使用相同或窄于固相 pH 梯度 pH 范围的载体两性电解质。

4）将样品加在凝胶之上；

5）将铂金电极分别放在滤纸电极条的中心，再将阳极和阴极分别同电源的正、负极相连；

6）接通电源，按下表电参数进行聚焦电泳[25,26]。

表 7.6 双向电泳电参数

	电压（V）	电流（mA）	功率（W）	时间（h）
第一相预聚焦	300	1	1	1～4
第二相聚焦	3500	5	10	12～16
第三相聚焦	3500	2	5	2

7.2.6 聚焦后处理

7.2.6.1 确定 pH 梯度

固相 pH 梯度凝胶导电性很低，无法像载体两性电解质凝胶那样利用电极测定 pH。对宽范围的固相 pH 梯度可利用等电点标准品来测定；窄范围的 pH 梯度可依据其 pH 范围根据线性关系推算 pH 值及蛋白质等电点。

7.2.6.2 凝胶的后续处理

凝胶的固定，染色（考马斯亮蓝染色、银染、免疫固定等），干燥，保存均可参照其他章节方法进行。

7.2.7 讨 论

7.2.7.1 固相 pH 梯度的优缺点

固相 pH 梯度可窄至 pH0.1 的范围，因此其分辨率极高，可达 0.001pH；pH 梯度稳定，不漂移；灵活性大，可随意选择 pH 梯度和斜率；重复性好；加样容量大；样品中盐的干扰小；对碱性蛋白质也能很好地分离；无边缘效应，故可用很窄的胶条（如 5mm 宽）聚焦，特别适合于双相电泳的第一相。但固相 pH 梯度灌胶技术复杂，只能使用聚丙烯酰胺凝胶，电泳时需高电压，电泳时间长，窄范围 pH 测定困难，只能计算。

7.2.7.2 pH 范围的选择

固相 pH 梯度分辨率高，故使用于窄 pH 范围的分离。对未

知样品，应先用宽 pH 范围的载体两性电解质聚焦大致确定其等电点位置，再用固相 pH 梯度凝胶精确分离。对复杂成分样品和双相电泳的第一相，应采用宽范围的固相 pH 梯度凝胶。

7.2.7.3 蛋白质的可溶性和添加剂

固相 pH 梯度等电聚焦时，样品的处理方法同载体两性电解质等电聚焦方法大致相同，甚至要求比后者还低。但一些蛋白质可溶性很低，或在接近等电点时可溶性很低，此时必须使用增加可溶性的添加剂，如载体两性电解质、尿素、去垢剂等提高分离效果。膜蛋白等电聚焦时，样品和凝胶中加入载体两性电解质可增加膜蛋白的可溶性[19]。另外，固相 pH 梯度凝胶可以干燥后重新水化，所以添加剂，包括尿素、去垢剂、载体两性电解质等可在重新泡胀时泡入[18]。

7.3 双向凝胶电泳

7.3.1 简　　介

目前双向电泳大都指第一向为等电聚焦（载体两性电解质 pH 梯度或固相 pH 梯度），第二向为梯度 SDS-PAGE 电泳，即将等电聚焦的胶条或管状凝胶放在 SDS-PAGE 凝胶上根据蛋白质分子量进行电泳分离[10]。样品经过电荷和质量两次分离后，得到等电点和分子量的信息，电泳的结果不是条带，而是点。依据第一向电泳的差别，又可分成载体两性电解质 pH 梯度为第一向的双向电泳和固相 pH 梯度为第一向的双向电泳。

第二向 SDS-PAGE 前应将等电聚焦凝胶在 SDS 溶液中预先平衡。

7.3.2 仪　　器

参见第五章及本章等电聚焦有关章节。

7.3.3 操作步骤

7.3.3.1 载体两性电解质 pH 梯度为第一向的双向电泳

(1) 甘油

2-巯基乙醇

SDS

Tris

SDS-PAGE 所需试剂见第五章

(2) 工作溶液

20%SDS

1mol/L Tris-HCl

(3) 步骤

1) 若等电聚焦后立即进行第二向电泳，可在灌制等电聚焦凝胶时同时灌制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶（1.0 或 1.5mm），此时不必插入梳子，而以 0.5cm 水封盖胶面。等电聚焦凝胶也可冷冻保存，再进行第二向电泳。

2) 如上所述进行第一向等电聚焦电泳。

3) 等电聚焦后，切下 0.5cm 宽的等电聚焦胶条放入容器中。

4) 平衡：

平衡液（100ml）

2-巯基乙醇	5ml	5%
1mol/L Tris-HCl（pH6.8）	6.25ml	62.5mmol/L
20%SDS	11.5ml	2.3%
甘油	10ml	10%

加入双蒸水至 100ml。

a. 将平衡缓冲液加入放有等电聚焦胶条的容器中；

b. 平衡 15～30min；

c. 平衡好的胶条可立即放置于 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上进

行第二向电泳或于－80℃冷冻保存。

5）第二向电泳：

a. 吸净封盖于 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上的水；

b. 加入电极液（见第五章）；

c. 戴手套小心将等电聚焦胶条放置于 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上，防止气泡产生，并注意等电聚焦胶条的酸侧及碱侧；

d. 参照第五章进行电泳和染色。典型的双向电泳结果如图 7.3 所示。

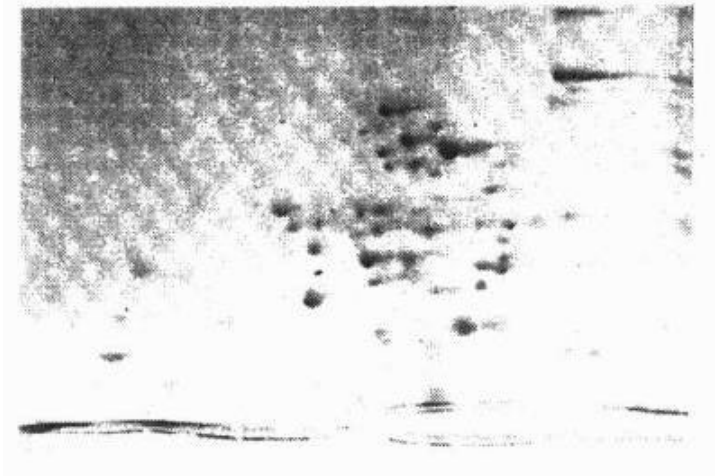


图 7.3　大肠杆菌粗提物的双向电泳结果（考马斯亮蓝染色）。水平向为 8mol/L 尿素存在下的 pH4～7 的等电聚焦电泳，纵向为 SDS-PAGE（引自文献［20］）

7.3.3.2　固相 pH 梯度为第一向的双向电泳

（1）工作溶液

• 裂解液

尿素	2.7g
Triton X-100	0.1ml
β-巯基乙醇（或二硫苏糖醇 100mg）	0.1ml
载体两性电解质 pH3～10	0.1ml

PMSF（phenylmethansulfonyl fluoride） 7g

双蒸水溶解后定容至 5ml。

- 样品液

尿素	5.4g
β-巯基乙醇（或二硫苏糖醇 100mg）	0.2ml
载体两性电解质 pH3～10	0.2ml
Triton	0.05ml

加少许溴酚蓝，用双蒸水溶解后定容至 10ml。在 -20℃下可保存 2 个月。

- 泡胀液（重新水化液）

尿素	9.6g
Triton	0.1ml
载体两性电解质 pH3～10	0.1ml
二硫苏糖醇	40mg

双蒸水溶解后定容至 20ml，当天新鲜配制。为了观察胶条的泡胀，加少许 Orange G 或溴酚蓝。

- 平衡液

1mol/L Tris-HCl（pH6.8）

（6.1gTris 溶解于 30ml 双蒸水中，用 1mol/L HCl 调至 pH6.8，双蒸水定容至 100ml） 20ml

尿素	7.2g
甘油	6ml
SDS	200mg

加入双蒸水至 100ml。

每 10ml 平衡液加 25～100mg 二硫苏糖醇（取决于样品）作为第一步平衡液；每 10ml 平衡液加 0.45g 碘乙酰胺作为第一步平衡液。

（2）凝胶的重新水化

作为双向电泳的第一向的固相 pH 梯度凝胶中必须含有尿素，去垢剂，载体两性电解质等，不能长期保存，故

通常制成干胶。干胶必须用含有这些成分的水化溶液重新泡胀。将干胶条于室温下平衡一段时间后，于新鲜配制的泡胀液中重新水化凝胶，通常需泡胀过夜。

(3) 样品处理和加样

可溶性样品，如体液，细胞或组织提取液可直接用于双向电泳。如有需要，可用裂解液裂解，然后用至少4倍体积的样品液溶解裂解后的样品。若样品中含有高盐或SDS，应用更高比例的样品液溶解。

(4) 等电聚焦

参见本章固相pH梯度等电聚焦电泳方法。

(5) 平衡

第一向胶条可在密封塑料袋中 -80℃保存达几个月[7]。如进行第二向电泳，先在第一步平衡液中平衡10min，再于第二步平衡液中平衡10min，用潮湿的滤纸吸干多余的平衡液。

(6) 第二向电泳

- 参见第五章配制合适的SDS聚丙烯酰胺凝胶。
- 将等电聚焦胶条的胶面朝下，贴于SDS凝胶上，避免气泡产生。为以后分子量测定，在SDS凝胶一端加蛋白质分子量标准。
- 参见第五章进行SDS电泳和染色。

7.3.4 讨　论

1) 堆积胶有时可引起等电聚焦方向的蛋白带变长[22]，如出现这种情况可不用堆积胶。

2) 第二向（SDS-PAGE）中的纹理现象（streaking）通常是由于第一向凝胶的平衡不充分，或第二向电泳时Tris缓冲能力不足造成的。银染时，2-巯基乙醇也可造成纹理现象。

3) 为了在第二向电泳中加入蛋白质分子量标准，应将蛋白

质分子量标准埋入含0.02%溴酚蓝的1%琼脂糖胶栓中。胶栓应在直径适当的管中制成。将胶栓切成0.5～1.0cm的小片，每片含蛋白质分子量标准5～10μg较适中，该胶栓小片可冷冻保存。第二向电泳前，将胶栓小片放置于SDS凝胶的一端。

4）载体两性电解质可如小分子量蛋白质在凝胶中迁移，在酸性条件沉淀并可被染色。所以等电聚焦后的固定步骤以去除载体两性电解质对于降低染色背景至关重要；但在固定液中过长时间孵育又可能导致蛋白质由凝胶中被洗脱出来，这会导致整个实验的重复性很差。

5）其他的双向电泳系统也被用来分离某些特殊类型的蛋白质。Sinclair和Rickwood详细讨论了用于分离核糖体蛋白，组蛋白和其他核蛋白的双向电泳系统[21]。

6）传统的载体两性电解质为第一向的双向电泳通常采用垂直板电泳方式，而现在的固相pH梯度等电聚焦为第一向的双向电泳通常采用水平电泳方式。水平电泳不仅操作方便，同时，水平电泳在分辨率，点的大小和分布方面明显优于垂直电泳[7]。

7）等电聚焦也可达到制备规模的蛋白质分离，同分析型的等电聚焦原理相同，遇到的问题也大同小异。现常采用三种介质：聚丙烯酰胺凝胶，琼脂糖凝胶和颗粒凝胶。对于实验室规模的制备等电聚焦，分离样品量的上限为1g，某些系统可在1h内完成这样数量的分离。有关的方法和操作请参见[1,6,14]。

参 考 文 献

[1] Allen, R.C., C.A. Saravis and H.R. Maurer. 1984. Isoelectric Focusing and Multiparameter Techniques. Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins: Selected Techniques. Berlin: Walter de Gruyter.

[2] Celentano, F., E., Gianazza G., Dossi Righetti P. G. Chemometr. 1987. Intel. Lab. Systems., (1): 349～358.

[3] Chiari M.and P. G. Righetti 1992. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis immobilized pH gradient in the first dimension (IPG-Dalt). the state of the art and controversy of vertical versus horizontal systems. Electrophorese., (13): 187 ~ 191.

[4] Giaffreda E., Tonani C. and Righetti P. G. 1993. pH gradient simulator for electrophoretic techniques in a windows environment. J. Chromatogr., (630): 313 ~ 327

[5] Giulian, G.G., R.L. Moss and M. Greaser. 1984. Analytical isoelectric focusing using a high-voltage vertical slab polyacrylamide gelsystem. Anal. Biochem., 142: 421 ~ 436.

[6] Hames, B.D. and D. Rickwood, eds. 1981. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. Oxford and Washington, D.C.: IRL press.

[7] Gorg A., G. Boguth, C. Obermaier et al. 1995. The Immobliline family: from "vacuum" to "plenum" chemistry. Electrophoresis., (16): 1079 ~ 1086.

[8] O' Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250: 4007 ~ 4021.

[9] O' Farrell, P.Z., H.M. Goodman and P.H. O' Farrell. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell, 12: 1133 ~ 1142.

[10] Phillips, T.A. 1988. DNA and Protein Engineering Techniques, two-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis of proteins. New York: Alan R. Lass.

[11] Pino, R.M. and T.K. Hart. 1984. Isoelectric focusing in polyacrylamide-agarose. Anal. Biochem., 139: 77 ~ 81.

[12] Walker J.M. ed. 1984. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Methods in molecularbiology, Vol. 1, Proteins. Clifton, New Jersey: Humana Press.

[13] Simpson, C.F. and M. Whittaker eds. 1983. Ultra-thin-layer isoelectric focusing. In Electrophoretic Techniques, London: Academic Press, 101 ~ 118.

[14] Radola, B.J. 1984. High-resolution preparative isoelectric focusing. Meth. Enzymol., 104: 256 ~ 274.

[15] Creighton, T.E. ed. 1989. Protein structure: A practical approach. Oxford: IRL Press.

[16] Righetti, P.G. 1990. Immobilized pH gradients: Theory and Methodology. Amsterdam: Elsevier, 69 ~ 79.

[17] Righetti, P.G. 1990. Immobilized pH gradients: theory and methodology. Amsterdam: Elsevier, 132 ~ 139.

[18] Righetti, P.G. 1990. Immobilized pH gradients: Theory and Methodology. Amsterdam: Elsevier, 161 ~ 171.

[19] Rimpilainen M.A. and Righetti P.G. 1985. Membrane protein analysis by isoelectric focusing in immoblized pH gradients. Electrophoresis, (6): 419 ~ 422.

[20] Robertson, E.F., H.K. Dannelly, P.J. Malloy and H.C. Reeves. 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigen system. Anal. Biochem., 167: 290 ~ 294.

[21] Hames, B.D. and D. Rickwood eds. 1981. Two-dimensional gel electrophoresis. of proteins: A practial approach, Oxford and Washington, D.C.: IRL Press.

[22] Creighton, T.E. ed. Protein structure: A practical approach. Oxford: IRL Press.

[23] Users manual of Multiphor II Electrophoresis system. Pharmacia LKB biotechnology AB 1992 p. 94 ~ 106.

[24] 郭尧君，郭强. 1994. 目前最高分辨率的电泳-固相 pH 梯度等点聚焦。生物化学与生物物理进展，(21)：143 ~ 146。

[25] 郭尧君，郭强，黄力力等. 1994. 用固相 pH 梯度等点聚焦分析 G 蛋白亚型。生物化学与生物物理进展，(21)：356 ~ 359。

[26] 郭尧君，李辛晖，朱海珍等. 1997. 转铁蛋白分型及其基因频率分布。生物化学与生物物理进展，(24)：540 ~ 542。

穆援越

第八章　蛋白质的毛细管电泳分析

8.1　引　　言

电泳是荷电物质（离子）在电场中因受吸引或排斥而引起的差速运动。1937 年，Tiselius 将其发展成为一种分离技术。尽管板状凝胶电泳是应用最广泛的分离技术之一，但存在分析时间长，效率低以及检测和自动化困难等问题。一种替代方式是在细孔管或毛细管中进行电泳分离。由于细径毛细管自身具有抗对流作用，凝胶介质不再是必需的。在毛细管中，既可进行自由溶液（或开管）电泳，也可使用传统的凝胶介质。

1967 年，Hjerten 报道了开管电泳的最初工作，由于那时只能获得毫米级孔径的毛细管，Hjerten 便采用使毛细管绕其纵轴旋转的方式来削弱对流造成的影响。后来 Virtanen 和以后的 Mikkers 则分别利用内径大约为 200 微米的玻璃和聚四氟乙烯管进行了毛细管电泳尝试。

1981 年 Jorgenson 和 Lukacs[1] 采用 75μm 开管毛细管和荧光检测器来分离和检测衍生化的氨基酸和肽，达到了 Giddings 理论预测的快速高效分离；并提出了操作参数与分离度之间的关系，奠定了毛细管区带电泳的理论基础。20 世纪 80 年代末，随着商品化毛细管电泳的问世，使这一技术得到了迅速的发展（分离原理见图 8.1）。

毛细管电泳的主要特点是柱效高（$N>10^5\sim10^6$）、分析时间短，所用样品量和试剂消耗少，操作模式多，更容易改变背景电解质，在线检测和自动化，使其成为同 HPLC 互补的分析技术，在生命科学领域显示出很好的应用前景。对肽和蛋白质的分析已

从对标准样品混合物的初步优化研究朝着应用方向发展，如定量测定重组蛋白及其污染物，CE/MS 用于蛋白质的表征，CE-免疫分析，配体-生物分子结合研究以及酶活性分析[2~4]。在基因工程、生化、临床、天然产物的分析方面已得到了较广泛的应用，成为基因工程领域中对重组蛋白生产的监控、下游处理和最终产物分析的最有吸引力的技术之一。在临床化学上用于内源性肽的分离、血红蛋白病诊断等。在食品分析中用于奶蛋白、大豆水解产物等的分析。

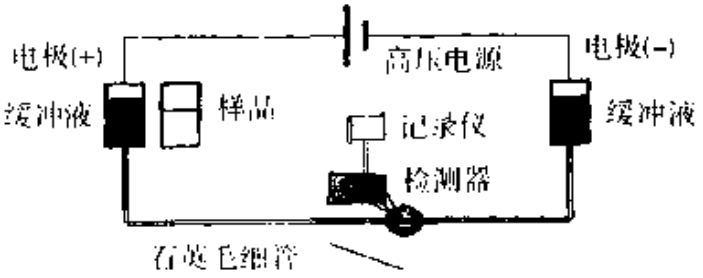


图 8.1　毛细管电泳装置示意图

8.2　影响分离效率的几个因素

焦耳热、扩散、电渗、电迁移扩展和样品同管壁的作用是电泳中伴随的几种重要现象。扩散效应减小了毛细管电泳的分辨能力。焦耳热引起的径向温度分布，使得温度、pH、密度、黏度等产生非均一性，但这种影响对具有良好恒温系统的电泳仪来说很小。同其他效应相比，扩散引起的峰扩展常可忽略，但不能够从电泳中消除。电迁移扩散是一种非稳态迁移，是由样品离子的有效淌度与背景电解质淌度不匹配引起的，虽然这种效应经常出现，相对于其他扩散效应来说则较小，还被用于样品浓缩以提高分析的灵敏度。毛细管内的电渗、样品同管壁的吸附作用则是成功进行电泳分析首先要解决的两个相互关联问题。

毛细管中的电渗流的流形是平坦的，电渗流与柱内径没有关系，它沿毛细管均一化地输运整个柱内的液体，对分离区带的扩

展没有贡献。但在许多情况下电渗流不稳定，特别是当分析蛋白质等高分子时，它们吸附至毛细管管壁改变了区域ζ电位，出现区域涡流，在毛细管内产生非平衡电渗流，对分离区带的扩散、分离和运行的重复性产生重要影响。采用化学方法如制备管壁动态涂层或永久涂层，物理方法有磁控法和电控法，通过改变管壁表面的电荷分布来控制电渗的大小和方向。

未处理过的毛细管内壁表面带有离子化基团，并从溶液中吸引带相反电荷的离子，因此可以认为它是一种离子交换剂；另一方面，吸附作用与蛋白质的等电点、稳定性、电荷分布等有关。由于大多数蛋白质是较大的两性分子，这一特性使它们成为内禀表面活性分子，离子同管壁的作用会改变其迁移行为。吸附过程也依赖于蛋白质分子内作用力，它导致蛋白质构象的改变，其程度与蛋白的稳定性有关，会使吸附和解吸行为产生很大差异。未解离的羟基也可同样品之间形成氢键。由吸附样品引起的样品-样品作用在涂壁毛细管中也存在。吸附到管壁上的物质改变了双电层，造成非均一电渗流、分离度和样品损失、迁移时间不重复以及额外的样品扩散。通常采用偏酸或偏碱的缓冲系统，使硅羟基不解离或使蛋白都带有与管壁同样的负电荷，产生静电排斥来抑制吸附；也可以在样品中加入竞争性吸附剂来减少这种效应。毛细管内壁的改性是解决这一问题的有效手段，制备吸附涂层或键合涂层来消除蛋白质的吸附，同时也改变电渗或消除电渗。

对蛋白与毛细管壁的研究还表明，带正电荷离子的吸附主要出现在毛细管的进口端，由此在柱内产生非均一电位的轴向分布。在电泳过程中，尤其是在高电压和碱性 pH 条件下，涂层的降解可能优先出现在毛细管末端，暴露的未涂覆的硅胶表面可能是造成峰形较差和产生电渗的原因，动态涂覆甲基纤维素能够改进毛细管的性能。

另外蛋白质的微不均一性、蛋白质之间以及蛋白质与其他大分子之间的相互作用和缓慢的动力学构象变化也是峰展宽的原因。电泳缓冲液的 pH、离子强度、变性剂的浓度和温度的变化

都会引起蛋白质的去折叠，对电泳分离结果造成不利的影响。

8.3 柱制备技术

8.3.1 键合涂层

虽然采用各种缓冲液添加剂能够有效减小蛋白吸附，涂层柱因其使用寿命长、缓冲系统和 pH 选择范围宽以及具有更高的柱效而得到重视。通常采用两步法制备化学键合相涂层柱，首先将双功能团试剂引入石英毛细管内壁，然后单体再同亚层的不饱和功能团共聚或者在剩余的一个功能团上接枝聚合物或其他基团。毛细管内壁键合线性聚丙烯酰胺代表了一种最早也是较为成功的方法，所用的双功能团试剂有 γ-甲基丙烯基氧丙基三甲氧基硅烷、γ-缩水甘油醚基丙基三甲氧基硅烷、氨丙基三乙氧基硅烷、乙烯丙基聚乙二醇 20M[5~11]。所形成的亚层的稳定性取决于毛细管表面的硅羟基的均一性分布、羟基化程度和形成的硅烷化物的内在稳定性，较大或长链的烷基基团表现出对抗酸水解的高稳定性。与 Si-O-Si-C 相比，Si-C 键则相对稳定得多，可采用格氏反应来制备 Si-C 键亚层。丙烯酰胺是常用于同亚层共聚的单体，丙烯酰胺基乙氧基乙醇形成的聚合物涂层柱的稳定性要比常规的聚丙烯酰胺长两倍，键合柱的电渗流非常小。

另一种制备亚层和涂层的简单方法是溶胶技术，烷氧基硅烷在酸或碱催化下形成寡聚分子或胶体，引入毛细管后经加热缩合形成三维网状结构，形成的聚合物亚层不受石英毛细管表面的影响。Guo 等人用 3-氨丙基三乙氧基硅烷的溶胶溶液，制备出了稳定的氨基硅胶涂层柱，在 pH＜6 时电渗流发生反转，可用于碱性蛋白的分离。

8.3.2 吸附涂层

采用物理吸附的方法来制备涂层柱相对来说比较简单，热固化 PVA 形成的永久涂层能有效地抑制电渗，使用范围较宽，是一种较好的涂层材料。聚合物也可吸附于衍生化的石英表面上，

Ng 等人制备了 PEO-PPO-PEO 共聚物涂层柱，用二甲基硅烷衍生化的亚层效果较好。

8.4 不同分离条件的影响

毛细管电泳中背景电解质的组成对选择性和柱效非常重要，通过改变缓冲系统的pH、配位作用和溶剂效应可以达到选择性分离的目的。在建立分析方法时应考虑缓冲容量、离子强度、比电导以及热消散。Everaerts 指出，虽然大多数工作都采用磷酸盐缓冲液，但使用 Good 类缓冲液能够改进毛细管电泳的分离性能，这种烷基磺酸类缓冲液具有缓冲容量高，比电导低的特点，热致区带展宽较小。Hjerten 等人设计的一类具有高分子量低电荷的低电导缓冲液能用于快速高分辨分离，在 2000V/cm 场强下的分离度与 330V/cm 时相同[2]（见图 8.2）。

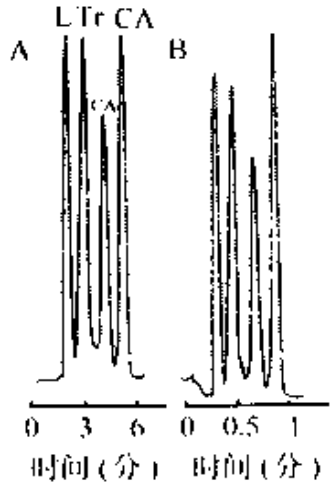


图 8.2 毛细管区带电泳分离几种标准蛋白

采用不同的梯度技术，施加外部电场等也能达到动态控制的目的。利用电渗流系数、样品淌度、缓冲液的黏度以及场强变化的优点，获得较高的分离度，缩短分析时间，减小谱带展宽。

8.5 毛细管电泳检测器

在毛细管电泳分析中，虽然只需要纳升的样品，但它并不是一个痕量的分析技术，所需样品浓度较高或者采用预浓缩方法。紫外-可见光吸收测定是蛋白质分析中应用最广泛而又接近通用的检测方式，激光诱导荧光检测是灵敏度最高的一种方式，可以得到几个分子的极低质量检测限。CE-MS 检测中，MALDI 电离方式的质量灵敏度为 pmol～fmol 水平，蛋白质的浓度灵敏度在 μg/ml级。以下所例为各种检测方式的一些特点。

表 8.1　各种检测方式的特点

检测方式	质量检测限 (mol)	浓度检测限 (mol/L)	优缺点
紫外-可见光吸收	$10^{-13}\sim10^{-16}$	$10^{-5}\sim10^{-8}$	接近通用型 二级管阵列可以给出光谱信息
荧光	$10^{-15}\sim10^{-17}$	$10^{-7}\sim10^{-9}$	灵敏度高 常常需要样品衍生化
激光诱导荧光	$10^{-18}\sim10^{-20}$	$10^{-14}\sim10^{-16}$	极端灵敏 常常需要样品衍生化 昂贵
质谱	$10^{-16}\sim10^{-17}$	$10^{-8}\sim10^{-9}$	灵敏，可以给出结构信息、 CE 和 MS 的接口复杂
圆二色散、喇曼光谱等			

假定进样体积为 10nl

8.6　实验操作

8.6.1　实验步骤

典型的 HPCE 的实验，一般包括以下几个步骤：

1）毛细管电泳柱的制备：清洗、反应与柱平衡；

2）移开进样端的缓冲溶液池，换上样品管；

3）使用低压或电迁移方式进样；

4）再换上缓冲溶液池；

5）施加分离所需的电压，进行电泳分析。

8.6.2　操作条件选择

（1）毛细管尺寸

最常用的为内径为 25～75μm 熔融石英毛细管，从分析时间上考虑，毛细管应尽可能得短，常用的有效长度（进样端至检测窗之间的距离）为 20～50cm。

（2）高压电源

HPCE 所用的高压电源要能提供 30kV 的直流电压和 200～

300μA 的电流。欲获得迁移时间的高重现性，须使电压稳定在±0.1%。电源极性应能切换。恒压方式最为常用，当进行等速电泳或温度不能很好控制时，则应采用恒流或恒功率方式，从而获得恒定的迁移时间。

(3) 温度控制

由于进样和迁移时间决定于溶液的黏度，应将温度控制在±0.1℃，这对于操作的重现性是很重要的。采用液体恒温较气体恒温更为有效。

(4) 进样量

样品区带长度应该小于毛细管长度的 1%～2%。样品超载会使峰变宽，峰形畸变。

(5) 进样方式

采用流体力学的方式，进样量基本不受样品基质的影响；电迁移进样时，进样量决定于每一个组分的电泳淌度，应注意歧视效应带来的影响。

(6) 样品预浓缩

在等速电泳和等电聚焦分析中，样品在稳态时可被浓缩许多倍，有利于紫外检测分析，但在毛细管区带电泳中，样品区带会展宽，因此常需要采用样品堆积、等速电泳和色谱法，通过对低电导介质的电动进样或压力进样来达到样品堆积的目的。非连续的缓冲系统被用于柱上低浓度样品的浓缩，进样体积较常规方法要大 30 倍。采用整个毛细管进样技术，样品可以浓缩 400～1000 倍。

瞬态等速电泳浓缩既可采用典型的等速电泳电解质系统，也可以在样品中补充高淌度的与分离的样品电荷符号相同的离子(co-ion)，而电解质的同号离子具有低淌度。在电泳过程中，由等速电泳模式逐渐转变为区带电泳模式。

色谱法预浓缩是先将样品捕集于一反相或亲和填料，然后用少量溶剂洗脱下来，同时使样品得到净化，如蛋白 G 和结合亚胺二乙酸金属螯合功能团的固定相。采用很低浓度的缓冲液和孔

径非常小的聚丙烯酰胺凝胶进行浓缩，样品中的水扩散入凝胶，盐分同时被脱除，可适用于少量样品的处理。

8.6.3 毛细管区带电泳

毛细管区带电泳（CZE）也称为毛细管自由溶液区带电泳，而称为毛细管自由溶液电泳可能更恰当一些。它是毛细管电泳中应用最广也是最简单的一种分离模式。在操作时，毛细管内充入缓冲溶液，溶质因迁延移率不同，在电场作用下形成分立的区带而得到分离。

毛细管区带电泳分离肽的方法优化中最重要的参数是缓冲液的 pH、浓度，除此之外，缓冲液添加剂如甲醇、乙腈、金属盐如 $ZnSO_4$ 以及蛋白都能改进分离。其他添加剂如两性离子、离子对试剂、离液剂（chaotropic agents）和亚胶束浓度的去垢剂有时也很有效。低离子强度缓冲液能增大淌度的差异，高离子强度则相反。对于那些分子结构非常相似、荷质比差异非常小的肽的分离，胶束电动色谱法是一较好选择。

对于未知蛋白样品的分析，应在不同的 pH 下进行研究，背景电解质的 pH 不要接近蛋白的等电点，以避免蛋白沉淀和使迁移时间延长两种不利情况，但这也不尽然，有时在接近等电点的 pH 下分离，各组分的差异增大。在 pH 5 ~ 10 范围内，采用 0.5mol/L 磷酸缓冲液对标准蛋白的分离，结果表明小孔径短柱对于蛋白质的快速分析非常适用，在高离子强度下蛋白质的迁移时间并不常是等电点的可预测的函数。对毛细管内径向 pH 梯度影响的研究表明，毛细管管壁的 pH 要较管轴体相 pH 低两个单位，如果体相的 pH 稍高于样品的等电点，靠近管壁时样品带正电荷，会造成峰拖尾甚至完全吸附，可通过提高缓冲液的离子强度来减小这一 pH 梯度效应。

8.6.3.1 操作中应注意的问题

1）所有样品组分均要溶于缓冲液中，当样品溶液和运行缓

冲液不同时，这种要求特别重要。

2）采用涂渍柱或不同的缓冲液添加剂抑制管壁吸附或其他相互作用。

3）先根据电压-电流曲线，以选择较佳的操作电压，偏离线性段的电压不是最佳电压。

4）用缓冲液组成（或 pH 及添加剂浓度等）对淌度作图以选择最佳的缓冲液体系。

5）缓冲液的损耗会导致淌度和电渗的变化，对这一影响的敏感与否视溶质而异，宜经常更换缓冲液，其频率可根据实验确定。

6）样品和缓冲液容器均要加盖，如果有温控装置应降低进样温度，在使用有机溶剂时要特别注意蒸发问题。

7）控制样品溶液的离子强度，样品溶液的电导率（包括样品本身的贡献）宜等于或小于本底电介质的电导率，要精确控制离子强度，谨防样品母液的影响，并尽可能地将样品置于一个低离子强度的溶液中。

8）如果使用压力进样，那么黏度有可能影响样品进入毛细管的量，可需要对样品进行稀释，以确保所配的样品有相同的黏度。

9）为防止样品蒸发及样品与样品之间的黏度差等因素造成定量上的困难，宜采用一个或两个内标，内标的加入还可以改善相对迁移时间的重复性。

10）必须使缓冲液和管壁之间有一个平衡，否则迁移时间的差别很大，可连续多次进样，确定平衡建立与否。

8.6.4 毛细管等电聚焦

毛细管等电聚焦（CIEF）是一项依据等电点差异进行蛋白质等分离的一种高分辨技术，基本上是一种平衡电泳方法，CIEF 分辨率可达 0.005pH 或更低。

在 CIEF 中，首先要用两性电解质在毛细管内建立 pH 梯度。

两性电解质是指那些同时具有酸性基团和碱性基团的两性离子化合物，在 CIEF 实验所需要的 pH 范围内（如 pH 3～10），由具有广泛 pI 值组分组成的混合物。聚焦过程由相继的相对较快的分离阶段和较慢的稳定阶段组成。毛细管内充满溶质混合物和两性电解质后，在电场作用下，两性电解质迁移至其等电点位置，pH 梯度很快形成。蛋白质在 CIEF 中能够保持在一个很窄的区带内，因为一旦它进入一个不同于其 pI 值的 pH 区域就会带上电荷，在电场力的作用下又会迁移回 pI 处。一旦聚焦完成即达到稳态，聚焦电流不再下降。

当聚焦过程完成后，需要对聚焦的蛋白区带进行检测。对常规的毛细管电泳仪来说，主要采用三种迁移方式：①利用电渗流；②改变阳极或阴极的电解质进行化学迁移；③流体动力学方法。

与平板凝胶 IEF 的染色不同，CIEF 一般采用固定的检测器，通常位于毛细管的一端，一般采用毛细管检测池窗前充以聚焦混合物或在载体两性电解质中加入四甲基乙二胺（TEMED），保证聚焦的蛋白质区带位于检测器前，以使所有组分均能得到检测。

对于利用电渗流迁移的一步聚焦法来说，蛋白质是在聚焦的同时通过检测器，采用动态涂敷或化学修饰的毛细管。非涂敷的毛细管 EOF 随 pH 变化极大，pH-t_R 呈非线性，在窄的 pH 范围校正曲线为近似的直线。这主要是由于碱性蛋白在 EOF 和阳极漂移作用下迁移，而酸性蛋白受 EOF 和阴极的作用；另外 EOF 是平均 pH 的函数，在聚焦过程中不断降低。

化学迁移方法是由 Hjerten 首先采用的。蛋白质先进行聚焦，然后在第二步通过阳极加盐或采用碱性电解质（阳极迁移）、阴极加盐或把阴极电解质换为酸来进行（阴极迁移）。阳极中阳离子浓度的升高，伴随毛细管中这些离子浓度的升高，导致 pH 的升高，使 pH 梯度快速迁移，阴极迁移与此类似。为防止导致区带变形，盐浓度一般在 0.1～0.02mol/L 之间。对残余的电渗

流采用加入聚合物进行动态涂敷来消除，这一方法能获得高效分离，校正曲线线性较好。

采用流体力学迁移方法，要保证一恒定的迁移速度，防止pH标准曲线偏离线性。使用重力或加气压，与此同时仍维持高压电场以防止因外加作用使迁移界面呈抛物线型而造成分离度损失，补偿迁移引起的波动。这一方法的重复性和pI校正曲线线性均较好。

对这三种方法进行的比较表明，当分析强碱性蛋白或要保证较高的线性，可采用流体动力学或化学迁移方法；对pH只有较小差别的蛋白质来说，采用化学迁移的方法可得到最高的分离度。

8.6.4.1 样品测定中需注意的问题

（1）去除样品中的盐分

在等电聚焦时，样品中存在的盐分会损害其分离度，部分原因是由于pH梯度宽度减小，除此之外蛋白质沉淀的危险增加，聚焦蛋白区带的迁移时间显著延长。因此含盐的样品应先透析或用凝胶柱脱盐。毛细管柱上脱盐，是在进行最后的分析性等电聚焦步骤前，先进行预聚焦，用两性电解质溶液替换盐分。如样品的盐浓度在0.1～0.5mmol/L之间，经5～30min脱盐后，各个组分均可得到检测。除此之外，脱盐也可使用低渗度的离子来完成，这一方法与透析法相比可获得较高的回收率。使用透析空心纤维进行在线脱盐，操作方便。

（2）防止等电聚焦过程中样品的沉淀

为了防止蛋白质在接近其等电点时沉淀，经常采用在聚焦缓冲液中加入非离子聚合物如甲基纤维素（MC）、羟丙基甲基纤维素（HPMC）的办法。然而对一些酸性蛋白，仍然能观察到沉淀出现，这在电泳谱上表现为一很窄的峰。采用加入8M尿素和5%巯基乙醇的变性条件进行CIEF分析，在此条件下的pI浓度与天然状态下的不同。也有人采用乙二醇、还原的Triton X-100

来防止形成沉淀。

(3) 等电点测定的标准品

毛细管等电聚焦中 pH 梯度是使用典型的参考物质如 pI 标记物来测定的。高分子量和低分子量两性离子化合物均可作为 pI 标准。考虑等电点附近迁移速度与 pH 的斜率、溶解度、同分析的物质无相互作用、溶液的长期稳定性等进行选择。也可用一组取代的氨甲基酚染料进行了评价，范围为 pI 5.3～10.4。这几种选择的 pI 标记物与蛋白质之间的作用较小，少量存在于溶液中不影响电渗流，可以用于梯度的表征，适宜的浓度范围为 0.001mg/ml 至约 0.05mg/ml。荧光标记肽可用于测定 N-端四甲基罗丹明标记的蛋白质的等电点。

8.6.5 毛细管凝胶电泳

凝胶电泳主要用于生物学上分离大分子物质，如蛋白质和核酸，它是基于分子尺寸，让溶质在合适的起“分子筛”作用的聚合物内进行电泳而获得分离。当带电溶质在电场力的推动下在聚合物的网状结构内迁移时，其运动要受到一定程度的阻碍，大分子受到的阻碍比小分子大。大分子物质，如 DNA 和被 SDS 饱和的蛋白质，由于其质荷比与分子大小无关，没有凝胶存在不可能实现分离。

由于毛细管本身已经具有抗对流的作用，不必再使用具有抗对流性质的凝胶。毛细管凝胶电泳（CGE）中所使用的“凝胶”把它叫做“聚合物网”更为恰当。CGE 中使用的聚合物可以是共价交联的（如交联聚丙烯酰胺）、氢键结合的（如琼脂糖）或是线状的聚合物溶液（如聚丙烯酰胺或甲基纤维素）。虽然非交联凝胶的聚合物结构与交联凝胶有着根本区别。但它们的分离机理是相同的，两种凝胶都能实现大分子的尺寸分离。板式凝胶电泳的多道分离，在 CGE 中难以实现，但是后者的快速分离能力弥补了这一不足。

低黏度的聚合物溶液可以利用压力进样，管内凝胶可以重复

更换（取决于其浓度和黏度），而且不易受空泡形成和其他因素的影响。当凝胶具备上述稳定性时，其黏度越低，对毛细管壁涂（如果使用的话）的依赖性越高。不论用哪种方式，通常都进行毛细管涂壁以降低 EOF。

8.6.5.1 凝胶柱制备和使用

（1）试剂的使用和保存

丙烯酰胺和 N，N-甲叉双丙烯酰胺是强烈的神经毒素，可经皮肤吸收，应小心处理。用缓冲溶液作溶剂来配，避光低温保存。长时间放置后，应检查溶液的 pH 是否为 7.

（2）向毛细管中引入预聚溶液

在灌预聚溶液之前，应先用水试验管道是否畅通。溶液可进行超声脱气，以除去其中溶解的气体。如采用真空抽液，应将毛细管插在真空瓶中的一端先拔出；如采用压力灌柱，须使压力装置内压力与大气压平衡后，才能让毛细管在溶液中的一端脱离液面。一般加 3 至 4 个大气压，使灌液时间不超过 30s。柱充满预聚液的标志是毛细管在溶液外的一端出现几个液滴。

（3）制柱时反应速度的控制

温度对反应的影响较大，这可以由引发体系的加入量来控制，使预聚液在 30～60min 内聚合，最好是 35～50min。当毛细管中充满凝胶预聚溶液后，不要再用手接触毛细管，以免引起管内温度局部升高，毛细管应远离热源，避免强光照射。

8.6.6 亲和毛细管电泳

亲和毛细管电泳（affinity capillary electrophoresis，ACE）是指在电泳过程中，当在电缓冲液中加入被分析样品的亲和配体，具有生物专一性亲和力的两种分子之间发生了特异性相互作用，形成受体-配体复合物。因自由受体、配体与复合物的电泳淌度不同，具有亲和作用的受体、配体与未发生亲和作用的受体、配体的电泳迁移时间不同。

8.7 应用实例

8.7.1 聚丙烯酰胺涂层毛细管电泳柱的制备

8.7.1.1 线性聚丙烯酰胺涂层毛细管电泳柱（Si-O-Si-键连接）

1）柱清洗：石英毛细管先经去离子水洗 5min，充入 1 mol/L NaOH放置 1h，再经去离子水洗 1h。

2）预涂 γ-甲基丙烯基氧丙基三甲氧基硅烷（γ-MAPS）：毛细管内充入 4% MAPS（用冰醋酸调节 pH 至 3.5），室温反应 1h，然后水洗。

3）制备线性涂层：毛细管内充入已脱气 3%～4%丙烯酰胺溶液（其中含有 0.1%TEMED 和 0.1% w/v 过硫酸铵）。室温反应 0.5～1h 后，经水洗去吸附的聚丙烯酰胺，即为线性聚丙烯酰胺涂层柱。

8.7.1.2 线性聚丙烯酰胺涂层毛细管电泳柱(Si-C-键连接)

1）柱清洗：石英毛细管先经去离子水洗 5min，充入 1mol/L NaOH放置 1h，再经去离子水洗 1h。通 N_2，在 110℃干燥 6h。

2）用吸气泵给干燥的石英毛细管通入氯化亚硫酰，10min 后，将其两段封闭，在 70℃反应 6h。

3）打开密封端，石英毛细管内通入 0.25 mol/L 乙烯基溴化镁/THF 溶液，将其两段封闭，在 70℃反应 6h。反应完毕后，打开密封端，石英毛细管内通入 THF 洗几分钟，再经去离子水清洗。

4）毛细管内充入已脱气 3%丙烯酰胺溶液（其中含有 0.1% TEMED 和 0.1% w/v 过硫酸铵）。28℃反应 1h 后，经去离子水洗去吸附的聚丙烯酰胺，即为线性聚丙烯酰胺涂层柱。

8.7.1.3 交联聚丙烯酰胺涂层毛细管电泳柱

毛细管先经清洗后，用7-辛烯基-1-三甲氧基硅烷进行预处理。然后，柱内静态涂敷聚合溶液（12.5 mg/ml 丙烯酰胺，2.5mg/ml 甲叉双丙烯酰胺，2.5 mg/ml 偶氮异丁腈，二氯甲烷为溶剂）。毛细管的两端密封后，以4℃/min 从50℃程序升温至120℃，在120℃继续反应2h。制备的毛细管柱在用前再经二氯甲烷和缓冲液清洗。

8.7.2 毛细管凝胶电泳分离蛋白质

采用SDS-CGE测定蛋白质的分子量，其范围可达2个数量级，分子量差异仅为4%的蛋白质也能获得极好的分辨率。以下为一个典型的分析条件。

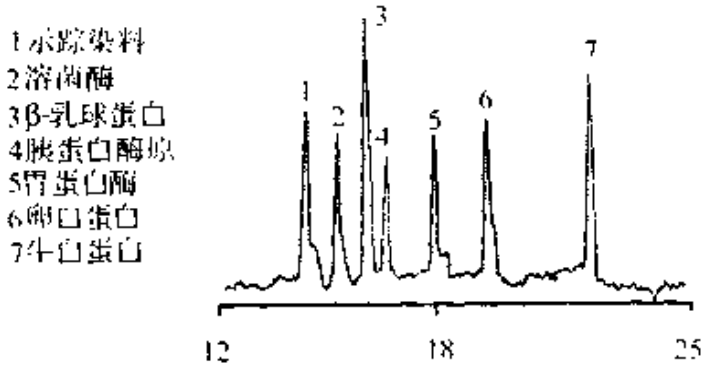


图8.3 毛细管凝胶电泳分离蛋白质

1）分离条件：聚丙烯酰胺涂层毛细管柱，毛细管有效长度：15cm，柱内径：75μm。

2）凝胶组成：甲叉双丙烯酰胺交联的聚丙烯酰胺凝胶，9% T，5% C，100mmol/L Tris-硼酸，pH 7.3，0.1% SDS，8mol/L 尿素。

3）电场强度：300V/cm，电流：12μA，检测波长：280nm。

在以上条件下，牛血清蛋白、卵清蛋白、胃蛋白酶、胰蛋白酶原、β-乳球蛋白、溶菌酶等均可得到完全分离。

8.7.3 毛细管等电聚焦

8.7.3.1 毛细管等电聚焦——一步法

(1) 毛细管等电聚焦分离血红蛋白

1) 分离条件：石英毛细管 27cm × 50μm 或 75μm，经 1.0mol/L 的 NaOH 清洗 10min 来活化表面。

2) 聚焦条件：阳极电解质为 20mmol/L H_3PO_4；阴极电解质为 20mmol/L NaOH。

3) 聚焦缓冲液：1.5% 两性电解质（pharmalyte）pH 3～10；0.1% 甲基纤维素，1.4% TEMED；11.5mmol/L 庚烷磺酸（离子对添加剂）；血红蛋白 A_0 和 S 浓度为 0.5mg/ml。

4) 工作电压：15～18kV，检测波长为 280nm 或 415nm；柱温为 30℃。

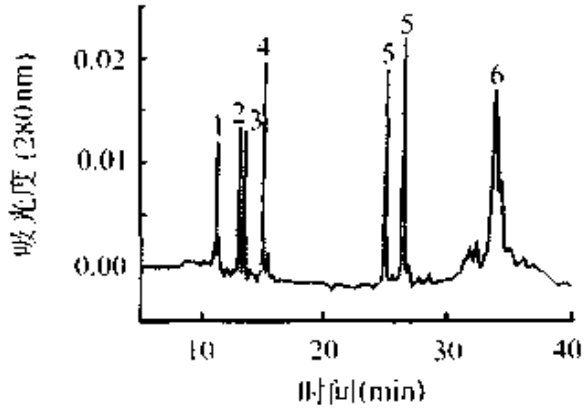


图 8.4 一步法毛细管等电聚焦

(2) 变性条件下毛细管等电聚焦分离标准蛋白[10]

1) 分离条件：石英毛细管 μ-sil DB-1（二甲基聚硅氧烷）。

2) 聚焦缓冲液：4% 两性电解质（pH 3～10）；0.4% 羟丙基甲基纤维素；1% TEMED，内含 8mol/L 尿素和 5% 巯基乙醇；标准蛋白浓度为 0.1μg/μl。

3）聚焦条件：阳极电解质为 20mmol/L H_3PO_4；阴极电解质为 20mmol/L NaOH；在 20kV 下聚焦 5min。

4）阴极迁移方式：阴极电解质为 20mmol/L NaOH + 30mmol/L NaCl，工作电压：20kV。

5）标准蛋白：①细胞色素 c（pI 10.6）；②胰蛋白酶原；③肌红蛋白（pI 6.8，7.2）；④碳酸酐酶（pI 5.9）；⑤β-乳球蛋白 A，B（pI 5.3，5.15）；⑥胰蛋白酶抑制剂。

8.7.3.2 毛细管等电聚焦——二步法[10]

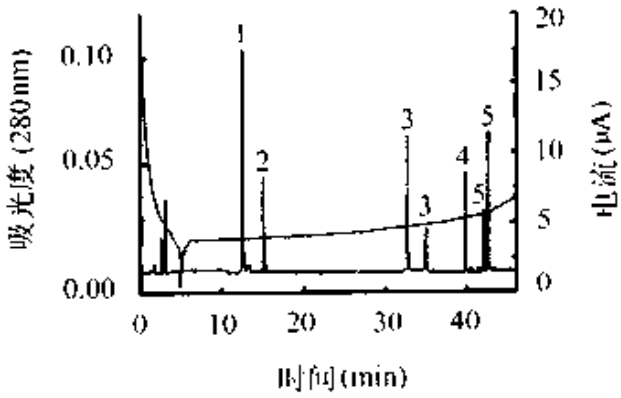


图 8.5 二步法毛细管等电聚焦分离标准蛋白质

1）分离条件：石英毛细管：*p*-sil DB-1（二甲基聚硅氧烷）。

2）聚焦缓冲液：4% 两性电解质（pH 3～10），0.8% 甲基纤维素，1% TEMED。

3）聚焦条件：阳极电解质：20mmol/L H_3PO_4；阴极电解质：20mmol/L NaOH，在 20kV 下聚焦 5min。

4）阴极迁移方式：阴极电解质：20mmol/L NaOH + 30mmol/L NaCl；工作电压：20kV。

5）标准蛋白：①细胞色素 C（pI 10.6）；②牛胰核糖核酸酶 A（pI9.65）；③肌红蛋白（pI 6.8，7.2）；④碳酸酐酶（pI 5.9）；⑤β-乳球蛋白 A，B（pI 5.3，5.15）。

参 考 文 献

[1] Jorgenson, J.W. et al. 1981. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillary. Anal. Chem., 53: 1298.

[2] Hjerten, S. 1996. Capillary electrophoretic separation in open and coated tubes with special reference to proteins. In B.L. Karger and W.S. Hancock ed. Meth. in Enzymology, 270: 297－319.

[3] Wheat, T.E. 1996. Principles and practice of peptide analysis with capillary zone electrophoresis. Molecular Biotechnology, 5: 263－273.

[4] Szoko, E. 1997. Protein and peptide analysis by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. Electrophoresis, 18: 74－81.

[5] Jorgenson, J.W. et al. 1983. Capillary zone electrophoresis. Science, 222: 266－272.

[6] Hjerten, S. 1985. Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. J. Chromatogr., 347: 191－198.

[7] Cobb, K.A. et al. 1990. Electrophoretic separations of proteins in capillaries with hydrolytically stable surface structures. Anal. Chem., 62: 2478－2483.

[8] Huang, M. et al. 1992. Hydrolytically stable cellulose-derivative coatings for capillary electrophoresis of peptides, proteins and glycoconjugates. Anal. Biochem., 207: 231－235.

[9] Nakatani, M. et al. 1995. Chemical stability of polyacrylamide-coating on fused silica capillary. Electrophoresis, 16: 1451－1456.

[10] Schwer, C. 1995. Capillary isoelectric focusing: A routine method for protein analysis. Electrophoresis, 16: 2121－2126.

[11] Denton, K. A. and S. A. Tate 1997. Capillary electriphoresis of recombinant proteins. J. Chromatogr., 697: 111－121.

[12] Heiger, D.N. 1992. High Performance Capillary Electrophoresis-An Introduction. Hewlett Packard Corp.

[13] 林炳承. 1996. 毛细管电泳导论. 北京：科学出版社.

[14] 刘晓达. 1997. 毛细管电泳技术及其在蛋白质类产品分离与鉴定中的应用研究. 军事医学科学院博士学位论文.

刘晓达　马立人　王全立

第九章　免疫印迹

9.1　引　　言

本章讨论一种检测固定在固相基质上的蛋白质的免疫化学方法，即免疫印迹（immunoblotting）或蛋白质印迹（Western blotting）[50]。进行免疫印迹之前必须具备可特异性识别目的蛋白质的单抗或多抗，及含有目的蛋白质的粗制或纯化的样品。蛋白质依据其分子量（SDS-PAGE，第五章）、大小及电荷数（非变性凝胶电泳，第六章）、等电点（等电聚焦，第七章）电泳分离后，免疫印迹可非常有效地鉴定某一蛋白质（或表位）的性质。另外，结合免疫沉淀方法，免疫印迹可用来定量分析小分子抗原。免疫印迹的其他应用本章中另有介绍。将蛋白质固定在膜基质上比直接在凝胶上检测更有优势，因为蛋白质在膜上更容易让试剂接近，膜比凝胶更易于操作，试剂用量更少，更省时[19]。

检测灵敏度：10pg（辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记）

1pg（免疫金或^{125}I标记）

免疫印迹原理见参考文献［19］。

免疫印迹概述

免疫印迹可分成两个步骤：蛋白质由凝胶转移至固相基质；特异性抗体检测。

蛋白质转移通常由电泳实现，现常用的方法有二：①半干法：将凝胶和固相基质似三明治样夹在缓冲液润湿的滤纸中间，通电10～30min可完成转移；②湿法：将凝胶和固相基质夹在滤纸中间，浸在转移装置的缓冲液中，通电45min或过夜可完成转移。

本章只讨论湿法转移，因为湿法转移在不明显增加费用和时

间的同时有更好的适应性。本章中只介绍 Bio-Rad 公司的电转移装置，其他电转移装置的转移条件很容易据此进行调整。

转移结束后，蛋白质的检测可进一步分成三个步骤。首先，将膜同特异性抗体孵育数小时或过夜，然后将膜同可特异性识别上述抗体（一抗）的第二抗体（二抗）孵育。通常，二抗（一抗用兔来源抗体时，二抗常用羊抗兔免疫球蛋白抗体）连接有如辣根过氧化物酶等标记物。目的蛋白质可由该酶催化的显色反应在膜上形成有色产物加以检测。其他检测体系，如碱性磷酸酶、免疫金，^{125}I 等本章也将介绍。

9.1.1 免疫印迹用膜

硝酸纤维素膜和尼龙膜是免疫印迹中常用的两种膜，大多数应用中硝酸纤维素膜是首选，因为硝酸纤维素膜不仅便宜，而且可简单快速地封闭非特异性抗体结合。

在下列情况则常用尼龙膜：①需要更高的蛋白质结合率（尼龙膜为 480μg/cm^2，硝酸纤维素膜为 80μg/cm^2[19]）；②已知该蛋白质同硝酸纤维素膜结合能力弱（尤其是某些高分子量蛋白质和酸性蛋白质）；③需要更强的机械强度。尼龙膜的应用受到限制主要是因为尼龙膜比较昂贵，封闭非特异性结合的过程繁琐，并不能用阴离子染料（anionic dyes）进行总蛋白质染色。

9.1.2 将蛋白质固定在膜上的其他应用

1）表位作图
2）结构域分析
3）斑点印迹
4）功能实验中蛋白质复性
5）配基结合
6）改进放射自显影
7）抗体纯化
8）为制备抗体时获得相应的蛋白质抗原

9）蛋白质鉴定：氨基酸组成分析和序列分析

9.2 免疫印迹操作

9.2.1 仪　　器

1）电转移装置

本章只介绍 Bio-Rad 公司的微型电转移装置，其他国内外厂商提供的装置同样有效

2）电源装置（200V，0.6A）

3）3MM　Whatman 滤纸

4）2.0 或 0.45μm 孔径大小的硝酸纤维素膜

硝酸纤维素膜应储存在低温干燥处，操作时应戴手套以免膜被污染。

5）塑料袋（Seal-A-Meal）

6）塑料或玻璃容器（15cm×10cm×2cm）

7）摇床

8）浅盘（30cm×15cm×3cm）

9）磁力搅拌器

9.2.2 试　　剂

（1）转移缓冲液

1）Tris

2）甘氨酸

（2）Tris 缓冲盐溶液

1）Tris　2 mol/L，pH7.0

2）NaCl　4 mol/L

（3）封闭液：牛血清白蛋白（BSA）

（4）辣根过氧化物酶显色液

1）氯萘酚（chloronaphthol）

2）甲醇（methanol）

3）过氧化氢（H_2O_2）

(5) 碱性磷酸酶显色液

1) $MgCl_2$

2) 2，5-二溴-4-氯-3-吲哚　磷酸盐（BCIP）

3) 二甲基甲酰胺（DMF）

4) 4 二乙基巴比土酸乙酸盐缓冲液

5) 氮蓝四唑（NBT）

(6) 免疫金孵育缓冲液：Tween 20

(7) 氨基黑总蛋白质染色液

1) 氨基黑 10B

2) 异丙醇

3) 乙酸

(8) 印度墨水总蛋白质染色液

1) Tween 20

2) 印度墨水

(9) 免疫印迹去除缓冲液

1) 脱脂奶粉

2) SDS

3) Tris

4) 2-巯基乙醇

9.2.3 操作步骤

9.2.3.1 转　　移

所需时间：至少 90min，或过夜。

将目的蛋白质经聚丙烯凝胶电泳（SDS 电泳，Native 电泳，IEF 电泳）分离后进行转移操作。转移前最好电泳两块胶板，一块直接染色，另一块进行免疫印迹。也可以在电转移之后用总蛋白质染色法在硝酸纤维素膜上染色。

9.2.3.2 转移缓冲液

1.93g Tris　15.6 mmol/L

9g 甘氨酸　120 mmol/L

加双蒸水至 1L，不加调整时 pH 应为 8.1～8.4；也可配成 20×储存液。

9.2.3.3 准备工作

配置 1L 转移缓冲液并冷却至 4℃。

冷却装置中加入双蒸水，冰冻过夜。

（1）转移池和硝酸纤维素膜预处理

1）将硝酸纤维素膜浸泡在转移缓冲液（30～40ml）中 15～20min；

2）用双蒸水清洗缓冲液池；

3）插入转移电极、在缓冲液池中放入搅拌子、池中加一半缓冲液（约 400ml）；

4）插入冷却装置。

（2）聚丙烯酰胺凝胶-膜“三明治”（图 9.1 和图 9.2）

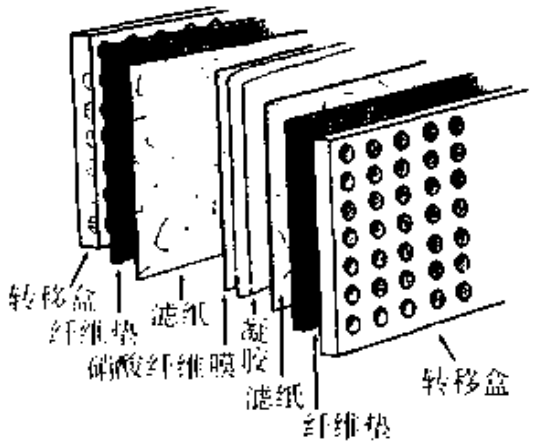


图 9.1　聚丙烯酰胺凝胶-膜“三明治”

1）打开转移盒并放置浅盘中，用转移缓冲液将海绵垫完全浸透后将其放在转移盒壁上，海绵上再放置一张浸湿的 Whatman 3MM 滤纸；

2）小心将凝胶放置于滤纸上，避免气泡（用转移缓冲液润湿并戴手套）（图 9.3）；

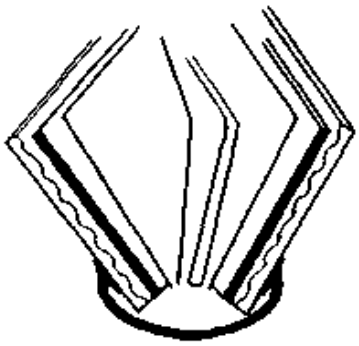


图 9.2 聚丙烯酰胺凝胶-膜“三明治”侧面图

3）以转移缓冲液湿润胶面，小心将硝酸纤维素膜放在胶面上（从凝胶的一边开始轻轻放下可避免气泡（图 9.4），注意一定要戴手套或用镊子接触膜）；

4）在硝酸纤维素膜上放一张浸湿的 Whatman 3MM 滤纸，用一干净的小试管轻轻滚过凝胶-膜“三明治”以消除所有气泡（图 9.5）；

5）将另一块海绵用转移缓冲液浸透后放在凝胶-膜“三明治”上，关上转移盒并插入转移池（图 9.6）；

6）转移池中注满转移缓冲液。

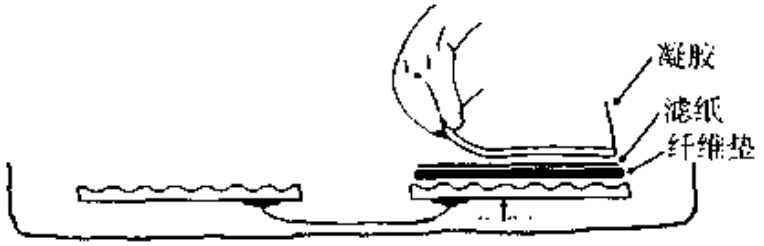


图 9.3 凝胶放置于滤纸上

图 9.4 硝酸纤维素膜放置于凝胶上

（3）电转移

1）将整个转移装置放在磁力搅拌器上并开始搅拌；

2）连接好电极；

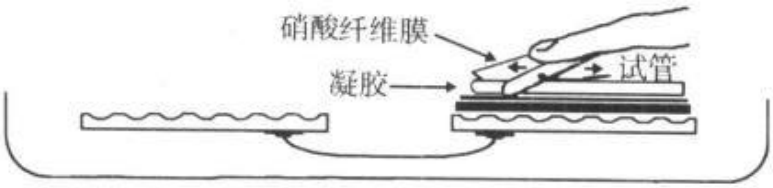


图 9.5　用试管去除

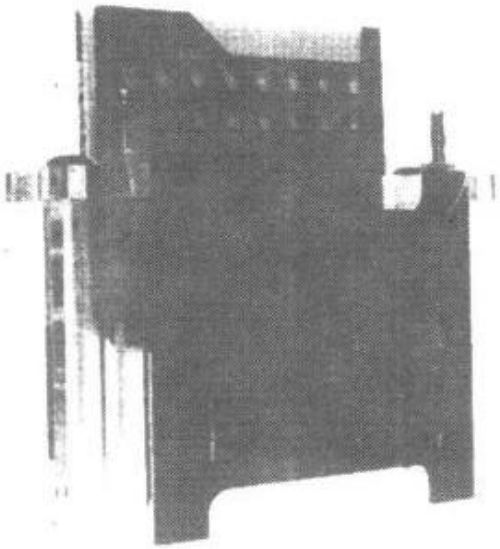


图 9.6　将转移盒插入电转移池

3）恒压 100V 转移 1h。对冷却的转移缓冲液，开始时电流应为 0.2A，最终电流为 0.4A。
若转移过夜则恒压 30V。

9.2.3.4　电转移的注意事项

1）开始转移时一定要检查电流大小，过高电流产生的热量会导致转移失败。通常高电流是由于转移缓冲液配置不当造成的。
2）低离子强度转移缓冲液可使用较高电压，而不会导致高电流和过热，但转移过程中由凝胶中渗出的电解质可导致转移缓冲液电导增加，缓冲能力降低[18]。

3）也可在恒流状态下以 200mA 转移 2h[19]。

4）若转移中因凝胶变形发生条带扭曲或由于凝胶中电解质渗出导致过热，可预先将凝胶在转移缓冲液中浸泡 15～30min[18]。

5）使用预先染色的蛋白质分子量标准品或转移后将凝胶染色可检查转移是否彻底。

6）对于较大蛋白质，较低的丙烯酰胺浓度可获得较好的转移效果[39]；另一种方法是采用两步转移，分别转移低和高分子量蛋白质[37]。

7）对于其他类型的膜或转移缓冲液，参照 Bio-Rad 公司用户手册调整转移条件。

8）对电转移来说，最常遇到的问题是目的蛋白质转移效率低。转移效率可由转移后对凝胶或膜染色来进行观察。若目的蛋白质转移效率低可考虑用下列四种方法：

- 转移缓冲液中加入 20% 甲醇：
  尽管甲醇可降低蛋白质洗脱效率，但可增加蛋白质同硝酸纤维素膜的结合能力[19]；
  甲醇对高分子量蛋白质可延长转移时间[18]，但由于转移中 SDS 渗出将降低高等电点蛋白质的转移效率[2,39]。
  甲醇可防止凝胶变形[2]。
- 转移缓冲液中加入终浓度为 0.1% 的 SDS：转移缓冲液中低浓度的 SDS（0.1% 左右）可增加转移效率[46]，但可降低膜结合某些蛋白质的能力[39]。
- 使用小孔径的硝酸纤维素膜（0.2μm）
- 转移后立即用戊二醛交联：转移后立即用戊二醛将蛋白质交联在硝酸纤维素膜上，可增加小分子酸性蛋白同膜结合的稳定性，否则小分子酸性蛋白会由膜上扩散出去。使用时将转移后的膜在含 0.2% 戊二醛的 TBS 中浸泡 45min[51]。

9.2.3.5 免疫检测

蛋白质由聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜上之后，将利用抗体检测特异蛋白质。加入抗体前，需将膜在封闭剂中封闭。典型的封闭剂使用含 3%BSA 的 TBS。封闭非常重要，可防止抗体非特异性结合在膜上。一抗识别目的蛋白，而二抗识别一抗的 Fc 段。二抗标记有酶或其他显色系统。现介绍辣根过氧化物酶标记的二抗系统。修正方案中介绍碱性磷酸酶、免疫金和^{125}I 标记的二抗系统。

（1）灵敏度

辣根过氧化物酶：10～20pg

碱性磷酸酶：10～50pg

免疫金：1～25pg

^{125}I：50～100pg，高比活性^{125}I 可达 1pg

（2）所需时间

4～5h 或过夜

（3）所需溶液

TBS（Tris 缓冲盐溶液）

3% BSA/TBS 或 1%脱脂奶粉/TBS

5%BSA/TBS

TBS（Tris Buffered Saline），1L

5 ml	2mol/L Tris-HCl（pH7.5）	10 mmol/L
37.5 ml	4mol/L NaCl	150 mmol/L

957.5ml 双蒸水

也可配成 10×储存液。

所有操作可在室温或 4℃进行。

（4）膜的封闭

1）拆卸转移装置，将滤纸揭下；

2）用镊子或戴手套将膜放入容器中；

3）加入至少 8ml 3%BSA/TBS 溶液（液面须没过膜）；

4）轻摇 30～80min，注意保证膜的所有部分同溶液接触。根据蛋白质稳定性的差别，封闭后的膜可在含1mmol/L NaN_3 的 BSA/TBS 中保存过夜或数天。

（5）洗膜

弃去封闭液，用 TBS 洗膜三次

（6）一抗

1）弃去 TBS，将一抗适当稀释于 8ml 0.5% BSA/TBS 中。（选择稀释度见注意事项 9.2.3.4）；

为节省封闭液可将膜放置于塑料袋中操作。对于 6cm×8cm 的膜可加入 4ml 封闭液即可注意一定要完全去除气泡，否则气泡阻止抗体-蛋白质相互作用，造成假阴性结果。

2） 温和摇动至少 1h，过夜孵育可增加灵敏度。

（7）洗膜 I

弃去一抗，用 TBS 洗两次，每次 10min。

（8）二抗

1）弃去 TBS；

2）加入 8ml 适当稀释于 0.5% BSA/TBS 中的二抗；

3）温和摇动至少 1h 或过夜。

（9）洗膜 II

弃去二抗，用 TBS 洗膜 30min，共洗三次。（若一抗孵育时使用塑料袋，则现在应将膜移入玻璃或塑料容器中）

（10）显色

1）配置显色液：

1ml 氯萘酚溶液（30mg/ml 于甲醇中）

加入 10ml 甲醇

加入 TBS（室温）至 50ml

加入 30μl H_2O_2

2）弃去 TBS，加入显色液；

3）轻摇硝酸纤维素膜，观察显色程度；

4）若出现大量沉淀，请使用新鲜配置的显色液；

5）显色应在 5～30min 内完成；

6）用双蒸水洗膜终止显色反应，每次 30min，共三次；

7）用吸水纸吸干膜上水分，避光干燥保存（可放于塑料袋内夹在本中）；

8）一周内照相，否则信号将随时间延长而褪色，膜逐渐变黄。典型的免疫印迹结果如图 9.7 所示。

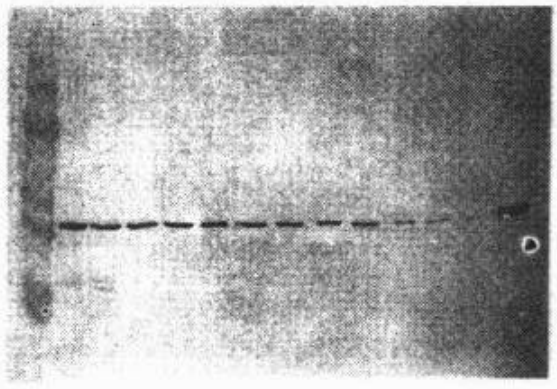


图 9.7　酵母管蛋白免疫印迹。样品由 20μg 到 0.62μg 按 2 倍系列稀释，每个稀释度两个泳道。最左侧泳道为蛋白质分子量标准品，最右侧泳道为脑管蛋白标准品。碱性磷酸酶染色

9.2.3.6　免疫检测注意事项

（1）膜的封闭和洗膜

1）转移后将硝酸纤维素膜 80℃真空干燥 1h 可稳定蛋白质同膜的结合[28]。

2）在第一步中也可用 3% 明胶/TBS 封闭。尼龙膜的封闭应在 45℃～50℃下于 10% BSA 中封闭至少 12h。

3）第二步洗膜后可将膜干燥后保存。再进行下面步骤时，需先用 0.5% BSA/TBS 将膜润湿。

4）BSA 是常用的降低背景的封闭剂，但 BSA 中常污染有免疫球蛋白 G，若使用蛋白质 A 检测时效果不理想。封闭剂也可选用 Tween-20 或明胶。

5）其他封闭剂包括：

- BLOTTO：5%脱脂奶粉，0.01%消泡剂 A，Sigma[30]；
- 3%明胶封闭，1%明胶抗体孵育；
- 0.05% Tween-20 封闭和抗体孵育[2]。

6）使用不同种奶粉可导致 BLOTTO 封闭效果的差异，有时其背景可能比 BSA 高[31]。另外，这类产品中常污染有免疫球蛋白 G，使用蛋白质 A 检测是会带来干扰。

7）低温下明胶易凝固也是要注意的问题。

（2）抗体的使用

1）步骤 3 和 5 中的一抗和二抗，经常使用时可稀释后分装，冰冻保存。

2）一抗和二抗浓度高时显色很深，但过高的抗体浓度可导致非特异性背景条带的产生。

3）抗体可用 0.5%BSA/TBS 稀释后储存在 −20℃[10]，反复冻融可导致抗体聚集，活性丧失。

4）抗体的稀释：

- 一抗：变异大，1∶10～1∶100 000
- 二抗：通常 1∶500～1∶4000

（3）免疫检测的常见问题

1）转移之后，蛋白质在硝酸纤维素膜两面分布不完全相同（观察预先染色的蛋白质分子量标准品的转移情况可知），因此，显色时应同时注意两面的信号。

2）SDS-PAGE 可能导致抗原性丧失，尤其是使用单克隆抗体时。

3）显色过浅的可能原因：

- 不当的储存或过度稀释可导致抗体失活或不饱和。一抗的活性可由将抗原直接点在硝酸纤维素膜上进行检测，

二抗活性也可通过与同种属不同的一抗的结合来检测。

- 硝酸纤维素膜上抗原量不足。硝酸纤维素膜总蛋白质染色或引入已知量的抗原对照。

4）背景过高的原因：

- 抗体孵育后洗膜不充分；
- 封闭不充分；
- 污染有海绵纤维或转移缓冲液；
- 抗体浓度过高，包括抗体缓冲液中的 Tween-20。

其他有关扩散或特异性背景条带问题的解决方法参考[23]。

(4) 辣根过氧化物酶

1）辣根过氧化物酶标记的二抗系统同氯萘酚反应时产生蓝-粉色。其他显色底物包括氨乙基咔唑（aminoethylcarbazole）（红色），二氨基联苯胺（deaminobenzidine）（棕色），可能会得到更高的灵敏度[23]。

2）在操作过程中装过二抗的离心管中沾有痕量的二抗，显色前，将 50～100μl 显色液加入上述离心管中，若 2min 内不能变蓝，说明显色液有问题。

3）氯萘酚的储存液可于 -20℃保存至少一年。

4）尽管辣根过氧化物酶检测系统经济，快速，但仍有缺点：

- 见光褪色；
- 内源性辣根过氧化物酶的非特异反应。

5）显色过浅的可能原因：

- 显色液失活，尤其是 H_2O_2 失活或氯萘酚已沉淀。用新鲜试剂配置新鲜显色液。
- 辣根过氧化物酶可能被不纯的甲醇或叠氮化物灭活。

9.2.4 其他检测方法的修正方案

9.2.4.1 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶标记二抗系统催化溴氯吲哚磷酸（BCIP）-氮蓝

四唑（NBT）反应形成暗粉色沉淀。该系统较辣根过氧化物酶系统的优点是颜色稳定，不褪色。

按照免疫检测步骤进行到洗膜Ⅱ，在二抗步骤中换成碱性磷酸酶标记的二抗。

显色[23]

1）配置显色液：

反应溶液可预先配置，可在4℃储存一年以上。

0.1 mol/L Tris-HCl（pH9.5），0.1 mol/L NaCl，5 mmol/L $MgCl_2$（碱性磷酸酶缓冲液）

50mg/ml BCIP溶于100%二甲基甲酰胺（BCIP溶液）

50mg/ml NBT溶于70%二甲基甲酰胺（NBT溶液）

2）碱性磷酸酶缓冲液洗膜5min。

3）显色液：

66μl NBT溶液同10ml碱性磷酸酶缓冲液充分混合均匀后加入33μl BCIP溶液。1h内使用。

4）弃去碱性磷酸酶缓冲液，加入10ml显色液。

5）室温下显色（37℃可加速反应）。

6）显色反应通常在30min内可完成。也可过夜反应以增加信号。用20mM EDTA/TBS洗膜终止反应。

9.2.4.2 免 疫 金

胶体金标记的二抗可获得稳定的信号，使用起来简便迅速。但获得高灵敏度结果需在显色后增加较复杂的增强步骤。

按免疫检测步骤进行至洗膜Ⅰ。

显色[28]

1）胶体金标记的二抗稀释于0.05% Tween-20/TBS中至$A_{525}=0.5$；

2）弃去TBS，加入二抗；

3）孵育 30～60min；

4）显色后以双蒸水洗膜。

免疫胶体金信号的银增强[9]

1）显色后用 TBS 洗膜两次，各 5min；

2）双蒸水洗膜 1min；

3）将膜浸泡于银增强液中 1～2min[14]；

4）水洗膜 1min；

5）定影液中定影 10min。

胶体金显色为红色，银增强后为黑色。胶体金使用前应短暂离心（250～4000×g）以去除凝聚的金颗粒。5nm 金颗粒较 15nm 金颗粒可获得更锐利的带型[46]。

9.2.4.3 ^{125}I 检测法

^{125}I 标记系统由于同位素操作和处理很不方便，加之半衰期短，需多次洗膜以消除背景，显色时间长，费用高，所以不常使用[3]。蛋白质 A 也不如二抗理想，因为蛋白质 A 不能识别所有种属的 IgG 及 IgG 的不同亚型，且同抗体的结合通常为单价结合[1]。

进行至免疫检测步骤洗膜 II 后，以^{125}I-二抗或^{125}I-蛋白质 A 替代酶标二抗。加入放射性标记蛋白后的所有溶液均需按放射性废料处理！^{125}I 标记蛋白的用量为 5～10mCi[31]或 2～5×10^6 cpm[40]。

检测[31]

1）彻底干燥硝酸纤维素膜，用放射性墨水在膜的一角做记号或用放射性标记的蛋白质分子量标准品。

2）将膜封入塑料袋。

3）－70℃下使用增感屏曝光（如 Kodak 公司产 X 光胶片）。

4）洗片。

9.2.5 总蛋白质染色

膜总蛋白质染色可帮助监测转移效率，确定免疫化学法检出的条带。实验中，最好将1～2个泳道的膜进行总蛋白质染色以监测转移效率，其他部分进行免疫印迹分析。现广泛使用的硝酸纤维素膜总蛋白质染色的方法包括氨基黑法、印度墨汁法和丽春红S法。上述三种阴离子染料在尼龙膜上可形成非特异性结合，染色效果不佳，但使用生物素-亲和素-辣根过氧化物酶法可在尼龙膜上获得满意结果。胶体金染色灵敏度最高。

检测水平

氨基黑	~30ng/条带
印度墨水	~6ng/条带
增强胶体金	~400pg/条带[3]
生物素	~10～50ng/条带[3]

9.2.5.1 氨基黑染色

1）0.1%氨基黑10B/25%异丙醇/10%乙酸　染色1min；
2）25%异丙醇/10%乙酸　脱色30min；
以水或TBS洗膜，干燥[19]。

9.2.5.2 印度墨水染色

1）0.5% Tween-20/TBS洗膜两次，每次5min；
2）在1μl印度墨汁/ml双蒸水中染色至少2h；
3）双蒸水中漂洗数次脱色，每次5min[20]。

9.2.5.3 丽春红S染色

1）0.2%丽春红S/3% TCA/3%磺基水杨酸中染色5～10min；
2）以TBS洗去染料；

3）丽春红 S 染色后可继续进行免疫检测[23]。

9.2.5.4 总蛋白质染色注意事项

1）在甲醇溶液中，阴离子染料染色可使硝酸纤维素膜变皱，印度墨水法无此效应；
2）印度墨水染色会掩盖可检出的放射性淬灭现象[20]；
3）某些蛋白条带因不同染色方法而差异着色，如酸性蛋白只在 pH3～5 时被胶体金着色[41]；
4）丽春红 S 染色灵敏度较低，且红色不易照相，但丽春红染色后可以洗去，不影响继续进行免疫检测。

9.2.6 免疫印迹清除

免疫印迹清除即去除已结合的一抗和二抗，这样一张印迹膜可以多次使用。但由于剧烈处理可能丢失某些表位。

清除缓冲液，100ml

6.25ml	1mol/L Tris-HCl（pH6.8）	62.5mmol/L
20ml	10%SDS	2%
0.7ml	2-巯基乙醇	100mmol/L
73ml	H_2O	

9.2.6.1 操作步骤

1）二抗显色后或放射自显影前，室温下 5%脱脂奶粉/TBS 中孵育尼龙膜或硝酸纤维素膜 10min；
2）吸水纸吸干水分。5min 后将膜放在另一张吸水纸上，防止膜粘在吸水纸上；
3）将干燥的膜在 70℃下于清除缓冲液中孵育 30min，去除一抗和二抗；
4）TBS 洗膜两次，每次 10min。再次进行免疫印迹检测前，硝酸纤维素膜应在 5%脱脂奶粉/TBS 中孵育 6h，尼龙膜应在 10%脱脂奶粉/TBS 中孵育 6～8h[31]。

9.3 讨　　论

9.3.1 膜的储存

1）为防止干燥时硝酸纤维素膜粘在吸水纸上，可先将膜于脱脂奶粉/TBS 中孵育 10min，用吸水纸干燥 5min 后，再移至新的吸水纸上[31]。

2）转移后的硝酸纤维素膜可储存至一年后再进行检测[19]。

9.3.2 转移异常

1）有时由于某些蛋白质恰好处于等电点，其电转移效率很低，这时应使用其他转移缓冲液[18]；强碱性蛋白质如组蛋白、溶菌酶、细胞色素等转移效率很低[47]。

2）对于含有碱性蛋白质的等电聚焦凝胶，SDS-尿素凝胶或非变性凝胶，电转移应在 0.7% 乙酸中反向进行，即向阴极方向转移。

3）超出膜的蛋白质结合容量可导致随后检测步骤中信号的降低[19]。

9.3.3 免疫印迹的其他应用

（1）表位作图[21,35]

（2）结构域分析[43,53]

（3）斑点印迹

可用于层析组分，蔗糖梯度或脉冲追踪实验的分析[7,24,48]。

（4）功能实验中蛋白质复性

尽管电印迹蛋白质的功能实验大多为配基结合实验，但随着蛋白质复性技术的进步现可建立其他特异性酶学实验。本书第六章已介绍了聚丙烯酰胺凝胶中的酶学实验方法，包括脱氢酶、磷酸酶、酯酶、氧化酶及肽酶。

电转移中保存酶活性的过程包括电泳前样品的处理，电

转移前凝胶的孵育，电转移后膜的孵育。电泳前和电泳中蛋白质样品的处理包括避免使用巯基试剂[13,29]、EDTA[18]和样品的加热变性[13]。聚丙烯酰胺凝胶处理包括缓冲溶液中漂洗凝胶以去除SDS[8,52]。硝酸纤维素膜在含低浓度去垢剂的溶液中孵育使蛋白质复性[22]。

(5) 配基结合

免疫印迹后多种配基可同蛋白质进行配基结合实验，包括：DNA[8,27,38]、RNA[8,42]、凝集素[24]、激素[22]、毒素[19]、病毒[12]、肝素[11]、钙调素[16,18]、组蛋白[8]、细胞[26]、GTP[33]、钙离子[17]、锌离子[44]。

(6) 抗体纯化[36,45]

(7) 由膜上收获蛋白质条带制备抗体[23,32]

(8) 蛋白质鉴定

氨基酸组成分析和序列分析。

极微量蛋白质（10pmol）转移到PVDF膜上或可进行氨基酸组成分析[49]和序列分析[34]。转移的蛋白质或多肽条带可经考马斯亮蓝染色后切下进行氨基酸组成分析或序列分析。

参考文献

[1] Allen, R.C., C.A. Saravis and H.R. Maurer. 1984. Gel electrophoresis and isolectric focusing of proteins. Selected techniques. Berlin: Walter de Gruyter.

[2] Bers, G. and D. Garfin. 1985. Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection. Bio. Techniques, 3: 276~288.

[3] Bio-Rad bulletin 1310. 1987. Western blotting detection systems: How do you choose?

[4] Bio-Rad Immun-Blot (GAR-HRP) Assay Kit Bulletin.

[5] Bio-Rad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual.

[6] Blake, M.S., K.H. Johnston, G.J. Russel-Jones and E.C. Gotschlish. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. Anal. Biochem., 136: 175~179.

[7] Bosman, F.T., G. Cramer-Knijnenburg and J.v. B. Henegouw. 1983. Efficiency and sensitivity of indirect immunoperoxidase methods. Histochemistry, 77:

185～194.

[8] Bowen, B., J. Steinberg, U.K. Laemmli and H. Weintraub. 1980. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. Nuc. Acids Res., 8: 1～20.

[9] Barada, D. and J. Roth. 1984. "Golder Blot" ——Detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein A——Gold complexes. Anal. Biochem., 142: 79～83.

[10] Burnette, W.N., 1981. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. Anal. Biochem., 112: 195～203.

[11] Cardin, A.D., K.R. Witt and R. L. Jackson. 1984. Visualization of heparin-binding proteins by ligand blotting with 123I-heparin. Anal. Biochem., 137: 368～373.

[12] Co, M.S., G.N. Gaulton, B.N. Fields and M.I. Greene. 1985. Isolation and biochemical characterization of the mammalian reovirus type 3 cell-surface preceptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1494～1498.

[13] Daniel, T.O., W.J. Schneider, J. L. Goldstein and M.S. Brown. 1983. Visulization of lipoprotein receptors by ligand blotting.J. Biol. Chem., 258: 4604～4611.

[14] Danscher, G. 1981. Localization of gold in biological tissue. Histochemistry., 71: 81～88.

[15] Earnshaw, W.C. and N. Rothfield. 1985. Identification of a family of human gentromere proteins using autoimmune sera from patiens with Scleroderma. Chromosoma., 91: 313～321.

[16] Flanagan, S.D. and B. Yost. 1984. Calmodulin-binding proteins: visualization by 125I-calmdulin overlay on blots quenched with Tween 20 or bovine serum albumin and poly (ethylene oxide). Anal. Biochem., 140: 510～519

[17] Fong, K.C., J.A. Babitch and F.S. anthony. 1988. Calcium binding to tubulin. Biochem. Biophys. Acta, 952: 13～19.

[18] Gershoni, J.M., e. Hawrot and T.L. Lentz. 1983. Binding of alpha-bungarotoxin to isolated alpha subunit of the acetylcholine receptor of Torpedo californica: quantitative analysis with protein blots. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80: 4973～4977.

[19] Gershoni, J.M. and G.E. Palade. 1982. Protein blotting: principles and application. Anal. Biochem., 131: 1～15.

[20] Glenney, J. 1986. Antibody probing of Western blots which have been stained with

india ink. Anal. Biochem., 156: 315~319.

[21] Glenny, Jr., J.R., P. Glenney and K. Weber. 1983. Mapping the fodrin molecule with monoclonal antibodies. J. Mol. Biol., 167: 275~293.

[22] Haeuptle, M. T., M.L. Aubert, J. Djiane and J. P. Kraehenbuhl. 1983. Binding sites for lactogenic and somatogenic hormones from rabbit mammary gland and liver. J. Biol. Chem., 258: 305~314.

[23] Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. New York: Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor.

[24] Hawkes, R. 1982. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. Anal. Biochem., 123: 143~146.

[25] Hawkes, R., E. Niday and J. Gordon. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem., 119: 142~147.

[26] Hayman, E.G., E., Engavall, E. A' Hearn, D. Barnes, M. Pierschbacher and E. Ruoslahti. 1982. Cell attachment on peplicas of SDS polyacrylamid gels reveals two adhesive plasma proteins. J. Cell Biol., 95: 20~23.

[27] Hoch, S.D. 1982. DNA-binding domains off fibronectin probed using Western blots. Biochem. Biophys. Res. Comm., 106: 1353~1358.

[28] Hsu, Y. H. 1984. Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. Anal. Biochem., 142: 221~225.

[29] Islan, M. N, R. Briones-Urbina, G. Bako and N.R. Farid. 1983. Both TSH and thyroid-stimulating antibody of Graves; disease bind to an Mr 179,000 holoreceptor. Endocrin., 113: 436~438.

[30] Johnson, D.A., J.W. Gautsch, J.R. Sportsman and J.H. Elder. 1984. improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids tranferred to nitrocellulose. Gene Analysis Techniques, 1: 3~8.

[31] Kaufmann, S. H., C.M. Ewing and J.H. Shaper. 1987. The erasable Western blot. Anal. Biochem., 61: 89~95.

[32] Knudson, K.A. 1985. Proteins transferred to nitrocellulose for use an antigens. Anal. Biochem., 147: 285~288.

[33] McGrath, J.P., D.J. Capon, D.V. Goeddel and A.D. Levinson. 1984. Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. Nature, 310: 644~6459.

[34] Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem., 262: 10035~10038.

[35] Mendelson, E., B.J. Smith and M. Bustin. 1984. Mapping the binding of

nomoclonal antibodies to histone H5. Biochem., 23: 3466～3471.

[36] Olmsted, J.B. 1981. Affinity purification of antibodies from diazotized pater blots of heterogeneous protein samples. J. Biol. Chem., 256: 11955～11957.

[37] Otter, T., S.M. King and G.B. Witman. 1987. A two-step procedure for effcient electrotransfer of both high-molecular-weight (>400, 000) and low-molecular-weight (<20 ,000) proteins. Anal. Biochem., 162: 370～377.

[38] Patel, S.B. and P.R. Cook. 1983. The DNA-protein cross: a method for detecting specific DNA-protein complexes in crude mixtures. EMBO. J., 2: 137～142.

[39] Peluso, R.W. and G.H. Rosenberg. 1987. Protein blotting: detection of proteins with colloidal gold, and of glycoproteins and lectins with biotin-conjugated and enzyme probes. Anal. Biochem., 144: 118～127.

[40] Renart, J. and J.V. Sandoval. 1984. Western blots. Meth. Enzymol., 104: 349～455.

[41] Rohringer, R. and D.W. Hfolden. 1985. Protein blotting: detection of proteins with colloidal gold, and of glycoproteins and lectins with biotin-conjugated and enzyme probes. Anal. Biochem., 144: 118～127.

[42] Rozier, C. and R.Mache. 1984. Binding of 16S rRNA to chloroplast 30S ribosomal proteins blotted on nitrocellulose. Nuc. Acids. Res., 12: 7293～7304.

[43] Russel, D.W., W.J. Schneider, T. Yamamoto, K.J. Luskey, M.S. Brown and J.L. Goldstein 1984. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. Cell, 37: 577～585.

[44] Serrano, L., J.E. Dominguez and J. Avila. 1988. Identification of zinc-binding sites pof proteins: zinc binds to the amino-terminal region of tubulin. Anal. Biochem., 172: 210～218.

[45] Smith, D.E. and P.A. Fisher. 1984. Identification, developmental regulation, and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in Drosophila embryos: application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides imimobilized on nitrocellulose blots.J. Cell Biol., 99: 20～28.

[46] Surek, B. and E. Latzko. 1984. Visualization of antigenic proteins blotted onto nitrocellulose using the immuno-gold-staining (IGS) -method. Biol. Biochem. Res. Comm., 121: 284～289.

[47] Szeweczyk, B. and L.M. Kozloff. 1985. A method for the efficient blotting of strongly basic proteins from sodium dodecys sulfate-polyacrylamide gels to nitrocellulose. Anal. Biochem., 150: 403～407.

[48] Talbot, P.J., R.L. Knobler, and M.J. Buchmeier. 1984. Western and dot immunoblotting analysis of iral antigens and antibodies; application to murine hepatitis virus. J. Immunol. Methods, 73: 177~188.

[49] Tous, G.I., J.L. Fausnaugh, O. Akinyosoye, H. Lackland, P. Winter-Cash, F.J. Vitorica and S. Stein. 1989. Amino acid analysis on polyvinylidene difluoride membranes. Anal. Biochem., 179: 50~55.

[50] Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels of nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350~4354.

[51] Van Eldik, L.J. and S.R. woichok. 1984. Conditions for reproducible detection of calmodulin and S100B in immunoblots. Biochem. Biophys. Res. Comm., 124: 752~759.

[52] Wolff, P., R. Gilz, J. Schumacher and D. Riesner. 1985. Complexes of viroids with histones and other proteins. Nucl. Acids. Res., 13: 355~367.

[53] Yurchenco, P.D., D.W. Speicher, J.S. Morrow, W.F. Knowles and V.T. Marchesi. 1982. Monoclonal antibodies as probes of domain structure of the spectrin a subunit. J. Biol. Chem., 257: 9102~9107.

穆援越

第十章　离子交换层析

10.1　蛋白质纯化

10.1.1　引　　言

离子交换层析在纯化蛋白质的层析手段中使用最为广泛。它对蛋白质的分辨率高，操作简易，重复性好，成本低。按照离子交换原理，蛋白质可从大量缓冲性溶液中被分离，所以此方法尤适于蛋白质粗提物的初始纯化。在分离蛋白质时，速度往往是很重要的，如蛋白酶的初始分离和不稳定蛋白质的纯化。离子交换层析提供了很多加速分离的手段。这些特点使离子交换层析成为极具价值的蛋白质纯化手段和设计蛋白质纯化方案时可行性很强的出发点。

可进行离子交换的蛋白质在实验条件下必须有单一电荷。溶液中单一电荷的蛋白质可被离子交换树脂上的小离子置换（指与蛋白质末端离子的交换）；固定在树脂上。通过提高溶液中相反离子浓度或降低蛋白质所带电荷数等方法可将蛋白质从树脂上洗脱下来。利用此法，可根据不同蛋白质电荷性质不同而将其分离开来。

若已知蛋白质的等电点，蛋白质分离的起始策略就很容易制定了。如果是未知蛋白质，通过离子交换预实验可得到很多关于蛋白质的生物物理信息并指导进一步的纯化处理。

10.1.1.1　离子交换原理

（1）蛋白质的等电点是进行离子交换层析的重要依据

同等电聚焦电泳一样，离子交换层析法利用不同蛋白质

表面电荷性质的不同达到分离、纯化蛋白质的目的。在pH值近中性的溶液中，暴露的精氨酸、组氨酸、赖氨酸残基带正电荷，而天门冬氨酸和谷氨酸残基则带负电荷。溶液pH值一定，同种蛋白质的净电荷就一定。pH值较低，净电荷一般为负；pH值较高，净电荷则趋向为正（见图10.1）。若溶液中蛋白质所带正电荷与负电荷相等，净电荷为零，则此时溶液的pH值即为这种蛋白质的等电点（pI）。进行离子交换层析的最佳溶液pH值一般与蛋白质的等电点相差一个单位。这可使蛋白质的净电荷量既可保证将其结合在离子交换树脂上，又不需在洗脱时采用使洗脱液的离子强度很大或与原溶液pH值相差悬殊等苛刻条件。

(2) 离子交换剂与蛋白质的结合

离子交换剂以自身所带相反电荷与蛋白质的净电荷结合。标准的离子交换剂由大量带电荷的侧链和不溶性的树脂结合而成。DEAE等阴离子交换树脂侧链电荷为正；CM等阳离子交换树脂侧链电荷为负。

DEAE $-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$

CM $-CH_2COO^-$

若蛋白质所带净电荷为负，则需用阴离子交换树脂进行纯化；反之则使用阳离子交换树脂。树脂一般使用高分子材料，如琼脂、纤维素和不同交连度的聚丙烯酰胺等。树脂材料的选择将在10.1.2.2中讨论。

(3) 蛋白质纯化的一般程序

蛋白质的离子交换层析是根据蛋白质与离子交换树脂的选择性结合。蛋白质溶液进入离子交换柱后，与离子交换树脂无亲和力的蛋白质被洗脱。余下的蛋白质均结合在树脂上，但与树脂的亲和力各不相同，可用逐渐增加洗脱液中NaCl浓度的方法将其逐一洗脱出来。比如，在离子交换时带负电荷的蛋白质取代了与阴离子交换树

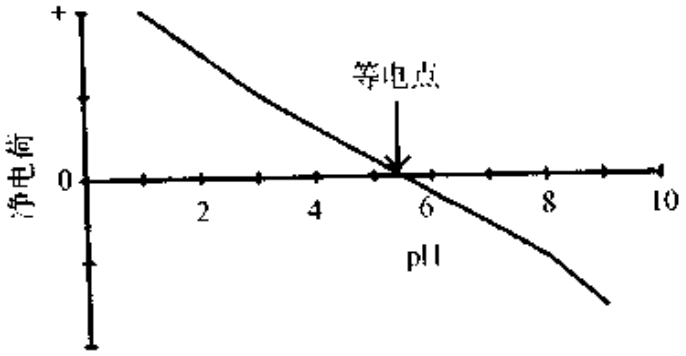


图 10.1　溶液 pH 值对蛋白质净电荷的影响

脂结合的氯离子而被固定在树脂上，此时溶液中的氯离子浓度若为 **0.1mol/L**，则当氯离子浓度提高到 **0.3** mol/L 时，与树脂结合力较弱的蛋白质将被洗脱，如果蛋白质与树脂结合力较强，洗脱液中氯离子浓度便需提高到 0.5mol/L。逐步增加洗脱液中离子浓度可将两种蛋白质完全的分离开。好的纯化蛋白质策略应通过改变实验条件而使树脂不结合目的蛋白；只吸收杂质。

(4) 常用蛋白质洗脱策略

蛋白质通过静电引力可逆地结合在离子交换树脂上。使蛋白质与离子交换树脂间离子键打开的常用办法是加大反荷离子（counterion 一般为 NaCl）的浓度。Na^+、Cl^-等反荷离子的分子量都很小，当它们在液相中的浓度很低时，可以轻易的从离子交换树脂上游离下来，不影响蛋白质与树脂的结合；随着在液相中浓度的提高，它们与离子交换树脂的结合力变强，又会与树脂结合而使被固定的蛋白质游离出来。此方法效果理想、成本低、操作简便、重现性好。NaCl 溶液洗脱法有两种方式：①步进式洗脱，洗脱液中 NaCl 浓度阶段性提高；②梯度洗脱，利用梯度仪逐渐加大洗脱液浓度。

(5) 不同反荷离子对洗脱的影响

一种离子交换树脂可与不同的反荷离子作用以达到洗脱蛋白质的目的。如与 DEAE 配合使用的就有 Cl^-、PO_4^{3-}、HCO_3^- 等。不同的离子与树脂亲和力不同，其强弱关系见表 10.1。如果某种离子溶液洗脱效果不好，可用另一种亲和力强的离子代替。

表 10.1　反荷离子活度关系

阳性竞争离子：$Ag^+ \gg CS^+ > K^+ > NH_4^+ > Na^+ > H^+ > Li^+$
阴性竞争离子：$I^- > NO_3^- > PO_4^{3-} > CN^- > HSO_3^- > Cl^- > HCO_3^- > HCOO^- > CH_3COO^- > OH^- > F^-$

(6) 其他蛋白质洗脱策略

离子交换时改变液相中缓冲体系的 pH 值是一种降低蛋白质与树脂亲和力的办法。对于阳离子树脂交换体系，液相 pH 值降低，蛋白质与树脂的亲和力会变弱；提高液相 pH 值则会减弱阴离子树脂交换体系中蛋白质与树脂的亲和力。亲和力的减弱是因为蛋白质所带净电荷的减少(见图 10.1)。将液相中的缓冲体系 pH 值调整到与蛋白质的等电点相近时，蛋白质几乎不会与离子交换树脂结合，很容易被洗脱。利用此法发展起来的色谱聚焦法就是通过判断蛋白质的等电点以区分不同蛋白质的。在文献 [1]、[3]、[5] 均对色谱聚焦法进行了描述并制定了有效的实验方案。如果没有色谱聚焦专用树脂和缓冲液，体系 pH 值的变化会暂时的改变溶液的离子强度。改变缓冲体系 pH 值的方法在实践中并不常用。

(7) 缓冲液

离子交换用的缓冲液必须慎重选择，若缓冲能力不够强，导致液相 pH 值的波动，会影响蛋白质与树脂的结合（见图 10.1)。如前所述，缓冲体系一定要控制液相 pH 值与蛋白质等电点相差一个单位。在溶液 pH 值与

缓冲体系中弱酸的 pK_a 相差一个单位时，缓冲体系的缓冲能力达到极限。若溶液所要求 pH 值与一缓冲体系中弱酸的 pK_a 相差在 0.4 个单位以内，此缓冲体系就是一个很好的选择。为了进一步提高缓冲体系的缓冲能力，反荷离子的离子强度应高于 10～20mmol/L。层析用缓冲体系所带电荷种类应与离子交换树脂相同，否则缓冲物质会与树脂结合；降低缓冲能力；引起溶液的 pH 值变化。表 10.2 列出了一些常用的离子交换层析用缓冲液。

表 10.2　离子交换层析用缓冲液*

pK_a	可控制 pH 值范围	缓冲液
用于阳离子交换树脂体系		
3.8	3.4～4.2	乳酸缓冲液
4.8	4.4～5.2	乙酸缓冲液
6.2	5.8～6.6	MES
6.6	6.2～7.0	ADA
7.2	6.8～7.6	MOPS
用于阴离子交换树脂体系		
6.0	5.6～6.4	组氨酸缓冲液
7.8	7.4～8.2	三乙醇胺缓冲液
8.1	7.7～8.5	Tris
8.8	8.4～9.2	二乙醇胺缓冲液
9.5	9.1～9.9	乙醇胺缓冲液

* 引自文献 [5] 和文献 [7]。

10.1.1.2　一般指引

利用离子交换层析纯化蛋白质在一开始应做好两个决定：①选择最佳的离子交换树脂和缓冲体系；②如何洗脱蛋白质。本节中，我们将为此提供一些线索。

(1) 树脂和缓冲体系的选择

1) 蛋白质的等电点已知

- 离子交换树脂的选择以层析条件下蛋白质所带净电荷为根据。带负电荷的蛋白质会与带正电荷的阴性离子交换树脂结合；带正电荷的蛋白质会与阳性离子交换树脂结合。溶液 pH 值高于蛋白质等电点时，蛋白质净电荷为负，反之则为正。
- 蛋白质的等电点决定了其在一定 pH 值的溶液中所带净电荷。为了使蛋白质与树脂的结合力强弱适中，溶液 pH 值应与蛋白质的等电点相差一个单位。一种等电点为 6.9 的蛋白质可在 pH 值为 5.9 的溶液中以阳离子交换树脂如 CM Sepharose CL-6B 层析或在 pH 值为 7.9 的溶液中以阴离子交换树脂（如 DEAE Sepharose CL-6B）进行层析。
- 最佳的 pH 值还应保证蛋白质的稳定性和活性，为此而进行的小量试验是必需的。

2) 蛋白质的等电点未知

- 确定蛋白质等电点最常用的方法是等电聚焦电泳。通过氨基酸序列推测出的等电点常与表观等电点相差一个单位。
- Pharmacia[4]推荐了一个当蛋白质因不纯而不能进行等电聚焦电泳时确定溶液 pH 值的简单方法。此时应测定蛋白质活性，具体 pH 值选择步骤见下文。

(2) 离子交换层析中溶液 pH 值的选择

1) 在九个试管中各放入 1ml 阴性离子交换树脂（如 DEAE Sepharose CL-6B）。

2) 用 10ml 0.5mol/L，pH 值为 5.0 的缓冲溶液润洗一号试管 10 次后；加入含 10mmol/L NaCl 的缓冲液平衡树脂。二号试管以 pH 值为 5.5 的缓冲液同法处理；以后各试管所用缓冲液 pH 值依次增加 0.5 个单位。

3） 去掉多余缓冲液，保证各试管中缓冲液高出树脂量为1ml。

4） 向各试管中加入100μl蛋白质溶液。

5） 混匀试管中物质，放置几分钟。

6） 检测上清液中是否存在目的蛋白。

离子交换层析的最佳实验条件围绕蛋白质性质而制定，还要顾及到不要使溶液pH值与蛋白质等电点相差太远。这些条件应使蛋白质的洗脱不需要很特殊的条件。选择条件时，正式洗脱后均须用浓度更大的NaCl溶液再次洗脱以判断洗脱效果，蛋白质活性也须进行测定。对一些与阴性离子交换树脂无反应的特殊蛋白质，可用阳性离子交换树脂（如CM Sepharose CL-6B）重复试验。若仍不结合，则将蛋白质粗提液直接通过阴、阳离子交换树脂联合体即可达到纯化目的。

（3）洗脱条件的选择

合适的反荷离子可以大大简化蛋白质的纯化。缓冲体系选定后，就该进行反荷离子的选择试验了。以下是一个实例。

1） 用含50mmol/L Tris缓冲液（pH值为7.9）、10mmol/L NaCl的溶液平衡10ml DEAE-Sepharose CL-6B离子交换树脂。

2） 在九个试管中各加入1ml离子交换树脂。

3） 用含0.1mol/L NaCl、50mmol/L Tris缓冲液（pH值为7.9）的溶液10ml润洗二号树脂十次，使树脂与0.1mol/L的NaCl平衡。

4） 同法处理三至九号树脂，但润洗液中NaCl浓度由三至九号依次为：0.2mol/L；0.3mol/L；0.4mol/L；0.5mol/L；0.6mol/L；0.8mol/L；1.0mol/L。

5） 去掉多余溶液，保证各试管中溶液高出树脂量为1ml。

6） 向各试管中加入100μl蛋白质溶液。

7） 混匀试管中物质，放置几分钟。

8） 检测上清液中是否存在目的蛋白。

- 随着溶液中 NaCl 浓度的增加，上清液中将会出现蛋白质，此时溶液中 NaCl 的浓度一般为 0.4mol/L 左右比较合适。若溶液中 NaCl 浓度在 0.1mol/L 这样低的水平时上清液中就含有蛋白质，就需要改变 pH 值以提高蛋白质与树脂的结合力了。在此试验中，可将 pH 值提高 0.2 个单位到 8.1。若溶液中 NaCl 浓度很高时蛋白质仍无法洗脱，调整 pH 值使之接近蛋白质等电点会降低蛋白质与树脂的结合力，不过选择另一种竞争能力更强的离子（如 PO_4^{3-}）将会在更温和的条件下改进试验。
- 若目的蛋白在 NaCl 浓度仅低于合适的洗脱液的洗柱溶液中仍吸附在树脂上，则此溶液可用于洗柱以除去与树脂结合能力较弱的杂蛋白。例如当目的蛋白质在 0.5mol/L NaCl 溶液中被洗脱时，0.3mol/L 的 NaCl 溶液很可能适于洗柱。层析中洗脱时间过长时可能导致部分目的蛋白的损失，过于简略的洗脱则可能遗留过多的杂质。

  吸附于离子交换树脂上的蛋白质可以用梯度和步进两种方式洗脱。步进式的优点在于操作简便、重现性好，适用于分辨率要求不高或洗柱用液 NaCl 浓度与洗脱液差别很大的情况。梯度洗脱适于分开结合能力相近的蛋白质，可用分步梯度洗脱或上述实例的方法鉴定被洗脱的蛋白质。在梯度洗脱中，当蛋白质峰将要出现时，洗出液体积应是树脂体积的五至十倍；而分步梯度洗脱所用洗脱液体积可以是树脂体积的三至十倍。洗脱液浓度达到 1mol/L 时，几乎所有的蛋白质将全部析出。若纯化精度要求不高，批量洗脱将节省大量时间。

10.1.2 方　　法

10.1.2.1 装　　置

（1）基本层析试验装置

图 10.2 为一套标准的离子交换层析装置。一个简单的装置可用于进行一些初步的探索工作；而大量的常规分离工作可由更正规的系统完成。本节所讨论的基本体系适合大多数情况下的蛋白质纯化。

1）层析柱：树脂一般装在玻璃或塑料管中，底部由一个多孔滤片支撑。多孔滤片与柱出口间存在一个小空隙，称

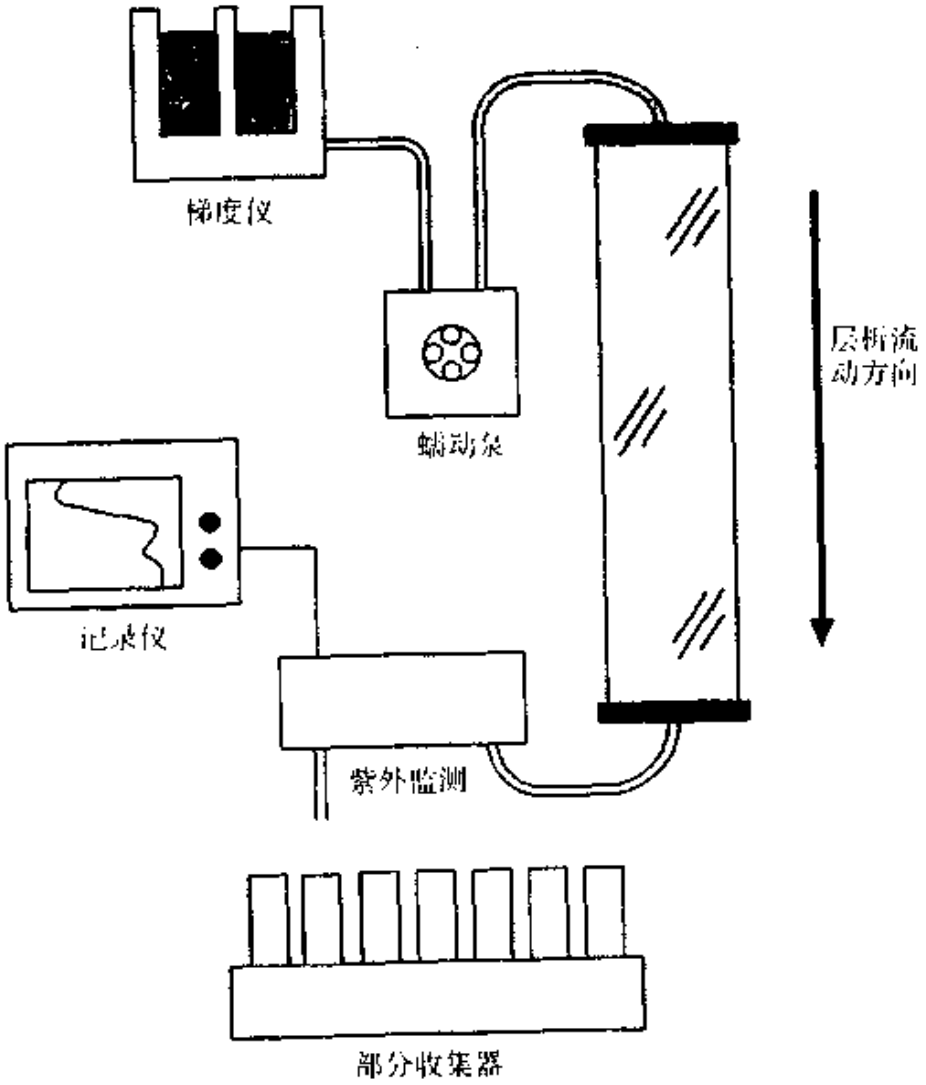


图 10.2　　离子交换层析装置

为死体积，这里可能发生样品的重新混合，使分辨率降低。柱顶最好安装一个流量调节器；它会使样品溶液或缓冲溶液平缓的进入树脂，对样品输入尤其有好处。加压层析时必须使用流量调节器。高精度分离要求柱高为柱直径的四至五倍；一般的快速分离柱高只需为柱直径的一至两倍即可。成品离子交换柱有商品出售。

2) 管道：储样器、离子交换柱和部分收集器之间用软管连接。软管一般用硅胶、聚四氟乙烯和环氧树脂制造。

3) 部分收集器：部分收集器根据系统运行时间或洗脱液流出滴数自动地在柱出口处更换收集瓶。当部分收集器根据运行时间更换收集瓶时，洗脱液流出速度的变化会导致不同收集瓶收集溶液量不同，可用蠕动泵解决此问题。洗脱液中蛋白质浓度的差别会使柱中流出液滴体积发生变化，所以根据流出液滴数更换收集瓶也不能保证各收集瓶中液量一致。

4) 紫外检测器：紫外检测器检测洗脱蛋白质与多肽的紫外吸收峰，可迅速得到洗脱液中的蛋白质成分。部分收集器收集的洗脱液也可用紫外分光光度计或其他方法检测。

5) 记录仪：记录仪可记录紫外检测器得到的紫外吸收峰。

6) 缓冲液存储器：常用烧杯或锥形瓶作为储存缓冲液的容器。

7) 蠕动泵：蠕动泵使溶液迅速而平缓的流过离子交换柱，谨防柱内发生堵塞，否则会导致压力积累；甚至发生柱管破裂的现象。

8) 梯度仪：梯度洗脱用的梯度仪可以购买或用两个烧杯和若干连管自己制作（见5.2）。

(2) 简单的离子交换层析系统

用滴管制成的简单离子交换柱可满足初步筛选或低精度、少量的蛋白质分离的要求。滴管下口用玻璃纤维塞

住，按上述方法加入树脂制成离子交换柱。可用手持1ml收集管收集洗脱液。

(3) 自动系统

高压下运行的自动层析系统适于长期多次进行蛋白质分离。它还有加速层析和提高重现性的能力。本节讨论的内容只适于低成本的蛋白质初纯化和要求较低的分离。

10.1.2.2 离子交换树脂的选择

如1.1.1所述，阴离子交换树脂用于处理净电荷为负的蛋白质；阳离子交换树脂用于处理净电荷为正的蛋白质。DEAE-或CM-Sepharose等琼脂基的树脂对很多蛋白质都是适用的。一些常用树脂列于表10.3。

表10.3 一些常用的离子交换树脂

名 称	类 型	树脂基	吸附容量 mg/ml	层析速度 cm/min	稳定pH范围
DEAE Sepharose Fast Flow	弱、阴离子	X-连接琼脂	3～110	12.5	1～14
DEAE Sepharose CL-6B	弱、阴离子	X-连接琼脂	2～170	1.7	2～14
DEAE Sephace I	弱、阴离子	珠状纤维素	10～160	0.17	2～12
DEAE Sephadex A-50	弱、阴离子	X-连接右旋糖苷	2～110		2～9
DEAE Trisacryl M	弱、阴离子	合成高聚物	80～90	3	1～11
DEAE Bio-Gel A	弱、阴离子	X-连接琼脂	45	>0.3	2～9.5
CM Sepharose Fast Flow	弱、阳离子	X-连接琼脂	15～50	12.5	2～14
CM Sepharose CL-6B	弱、阳离子	X-连接琼脂	10～120	2	2～14
CM Trisacryl M	弱、阳离子	合成高聚物	90～100	3	1～11
Bio-Rex 70	弱、阳离子	合成高聚物		0.4～15	5～14
CM Bio-Gel A	弱、阳离子	X-连接琼脂	45	>0.3	4.5～10
CM Sephadex C-50	弱、阳离子	X-连接右旋糖苷	7～140		6～10
Q Sepharose Fast Flow	强、阴离子	X-连接琼脂	3～120	6.7～11.7	2～12
QAE Sephadex A-50	强、阴离子	X-连接右旋糖苷	1.2～80		2～10
SP Sepharose Fast Flow	强、阳离子	X-连接琼脂	60	12.5	3～14
SP Sephadex C-50	强、阳离子	X-连接右旋糖苷	8～110		2～10
SP Trisacryl M	强、阳离子	合成高聚物	100	6	1～11

（1）离子交换树脂的类型

- 离子交换树脂除了以阴、阳分类外，还分为强离子交换树脂和弱离子交换树脂。强离子交换树脂在大部分 pH 范围内离子化程度都很高，弱离子交换树脂在工作 pH 值时离子化程度则很低。强离子交换树脂用于离子交换中液相 pH 值很高或很低的情况。过去大多数层析试验都是用弱离子交换树脂进行的，但强离子交换树脂能提供更好的重现性。
- 一个重要的离子交换树脂是羟基磷灰石。它使用磷酸钙结晶作为离子交换剂，可处理酸性和碱性蛋白质[2]。

（2）层析速度

树脂的形态应使层析时液相流动速度适中，让蛋白质有足够的时间吸附在树脂上。过高的层析速度虽然可节约时间，但也会降低试验精度。

（3）树脂吸附容量

树脂吸附容量是评估某种树脂处理蛋白质量的一种标准，其单位是毫克蛋白质/毫升树脂。可由它决定层析时使用树脂量。在高精度层析时最好只使用树脂最高吸附容量的 10%～20%。同样的树脂其吸附容量对于高分子量蛋白质要比对于低分子量蛋白质低，这是因为低分子量蛋白质与树脂的结合点更多。

（4）树脂的溶胀

Sephadex 等一些材料会被高压所压缩，或在离子条件改变时膨胀或萎缩。这样的树脂需要再生。树脂的膨胀会使层析柱的处理复杂化。新的树脂材料大多数已克服了这一问题。

（5）对 pH 值的稳定性

如果实验中 pH 值很低或很高，树脂一定要具有与之相当的稳定性。而且此时弱离子交换树脂的离子化程度会很小，应选用强离子交换树脂。

10.1.2.3 树脂的准备和层析柱的填装

层析柱的准备可分三个步骤：① 使干燥的树脂溶胀；② 将树脂装入柱中；③ 用无蛋白质的样品缓冲液浸泡树脂达到交换平衡。为保持蛋白质的活性，试验可在4℃下进行，此时所有设备和试剂均应冷却至4℃，并于此温度储藏。

（1）使树脂溶胀

商品树脂为干燥的粉末，必须用样品缓冲液浸泡使之溶胀，1g树脂在溶胀后体积可达5～50ml。

1） 将干燥树脂以大约十倍体积量的样品缓冲液浸泡（如10g树脂+100ml样品缓冲液）。

2） 煮沸1h以上或浸泡若干小时至若干天，使树脂充分湿润。煮沸时适量多加入样品缓冲液，保证上样缓冲液不被煮干。

3） 在溶胀过程中搅拌几次，保证树脂充分浸润。

4） 溶胀过程中更换几次样品缓冲液，使交换到树脂内的成分与样品缓冲液成分差别不大。

溶胀过程中不要使用搅拌磁子，它会将树脂打成小碎片。

（2）将树脂装柱

在装柱之前，树脂即须用样品缓冲液浸泡以达平衡。浸洗树脂有时需要数十倍于柱体积的样品缓冲液，这样可以节约大量时间。装柱用的树脂凝胶应为一份体积干树脂与一份体积样品缓冲液的混合物。高精度层析时柱高应为柱直径的4～5倍，对一般层析而言，柱高只需为柱直径的2倍。在装柱时一定要非常谨慎。装柱必须一次性完成，否则会严重影响蛋白质分离的精度与重现性。一个树脂储存器可以提供足够一次性装柱的树脂量（见图10.3）。

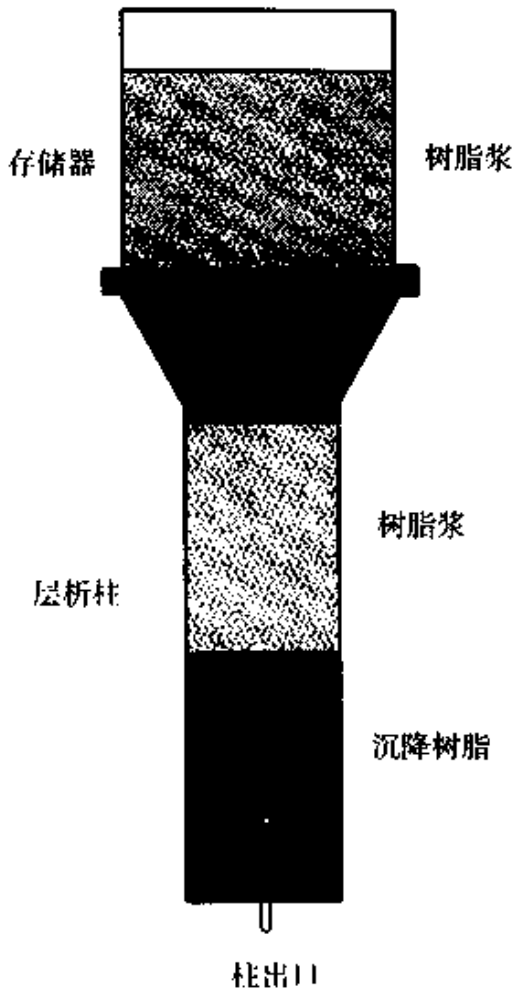


图 10.3　树脂存储器

1）在烧杯中用样品缓冲液浸洗树脂。搅拌 1min，测量 pH 值。若 pH 值与原样品缓冲液不同，倾泻掉大部分样品缓冲液，加入新样品缓冲液，重新搅拌和测量 pH 值。这一步骤叫部分平衡，它可以减少树脂在层析柱中正式平衡的时间；

2）若在室温下进行层析，将树脂真空抽气 1h 以除去其中的小气泡，抽气时摇动层析柱有助于气泡的赶出；

3）在层析柱中加入少量样品缓冲液；

4） 打开层析柱出口，导出少量上样缓冲液以赶出层析柱底部的空气；

5） 摇匀树脂，用一根玻璃棒将其导入层析柱，不要带入气泡；

6） 打开层析柱出口，在树脂堆积时加入更多的样品缓冲液；

7） 可用一个适配器进行装柱。确定没有气泡进入柱中，它们会影响层析速度，甚至使层析停止；

装柱时，长层析柱可稍微倾斜。值得注意的是，一些树脂慢速装柱的效果比较好，这样的树脂有葡聚糖凝胶树脂等；而另一些树脂，如琼脂凝胶树脂，最好快速装柱。

（3）使树脂达到交换平衡

装柱之后，用样品缓冲液最终润洗树脂，使其 pH 值和离子强度最终达到实验要求，并将树脂洗到基线水平。在这一步中使用的样品缓冲液一般不超过树脂体积的 10 倍。将样品缓冲液的 pH 值和电导率与洗脱液进行比较，确保树脂已达到平衡。

10.1.2.4 样品上柱

（1）样品的准备

样品溶液首先要通过离心分离或用 0.45μm 孔径滤纸过滤而成为澄清溶液。注意不要在这一过程中使目的蛋白损失。溶解蛋白质的样品缓冲液离子强度最好低于 50mmol/L。可用凝胶过滤法、透析法或超滤法达到此目的。稀释蛋白质溶液也是可供选择的一个方法。

注意：若目的蛋白在溶液中浓度过大，在局部发生 NaCl 浓度波动或 pH 值过高或过低时，很可能有损失。所以目的蛋白浓度最好低于 10mg/ml。

（2）进样

1） 打开层析柱底部出口，将上样缓冲液引入柱中，直至液

面达到树脂表面（见图 10.4）。关闭层析柱底部出口；

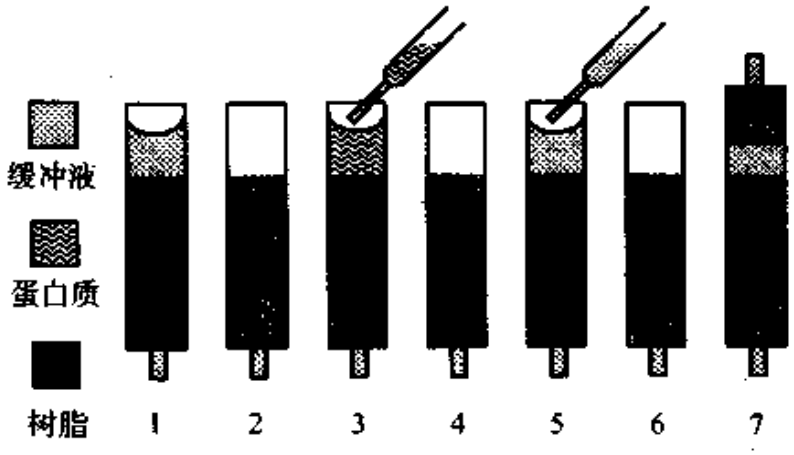


图 10.4　样品的加入

2）用移液管将蛋白质溶液缓慢的加在树脂面上；

3）打开层析柱的出口，让蛋白质溶液进入树脂，当溶液表面与树脂表面重合时，关上层析柱的出口；

4）在树脂表面缓慢的滴加少许上样缓冲液；

5）重复步骤 C 的操作；

6）重复步骤 D 的操作，并将层析柱挂起；

7）之后就可以进行蛋白质的层析和洗脱了。

注意：加入任何试剂时均不要产生气泡，否则会影响蛋白质的分离。加入溶液时可将滴管边加溶液边均匀地沿柱管做圆周滑动，使溶液平缓的注入到树脂床上。使用流量调节器可简化进样步骤。

10.1.2.5　洗柱和目的蛋白的洗脱

在洗脱任何结合蛋白质之前，使样品缓冲液持续流过离子交换树脂柱，可带走不与树脂结合的蛋白质，使之与吸附在树脂上的蛋白质分离。这一步骤一般要使用 3～10 倍于树脂体积的样品缓冲液。检测流出液的蛋白质浓度或光密度是必要的。当有微量蛋白质出现时，蛋白质的洗脱就应开始了。

如前所述，蛋白质的洗脱分为步进洗脱和梯度洗脱。步进洗脱时，每一阶段离子强度的增加不必一致，如用 NaCl 溶液洗脱

时，可分三步洗脱，NaCl 浓度依次为：0.1mol/L、0.5mol/L、1.0mol/L（见图 10.5）。梯度洗脱时洗脱液的离子强度是逐渐增加的，如将洗脱液中的 NaCl 浓度从 0.02mol/L 逐渐增加到 1.0mol/L（见图 10.6）。梯度洗脱可使不同蛋白质的分离更彻底，而分步梯度洗脱可简化步骤；加快速度。但分步梯度洗脱离子强度变化过大时，一些蛋白质将无法分离。

进行精确的蛋白质分离或两种蛋白质等电点相近时，梯度洗脱是必要的。步进洗脱可在预试验或目的蛋白洗出后采用。

（1）步进式洗脱（图 10.5）

1）在层析柱中通过 3～10 倍于树脂体积的洗脱液（如 20mmol/L Tris-HCl、0.1mol/L NaCl 溶液）。

2）使洗脱液面与树脂床面平齐，这样可以保证在加入不同浓度的洗脱液时 NaCl 浓度的变化不出现偏差。

3）将洗脱液换为第二种浓度；重复 1）、2）步操作。

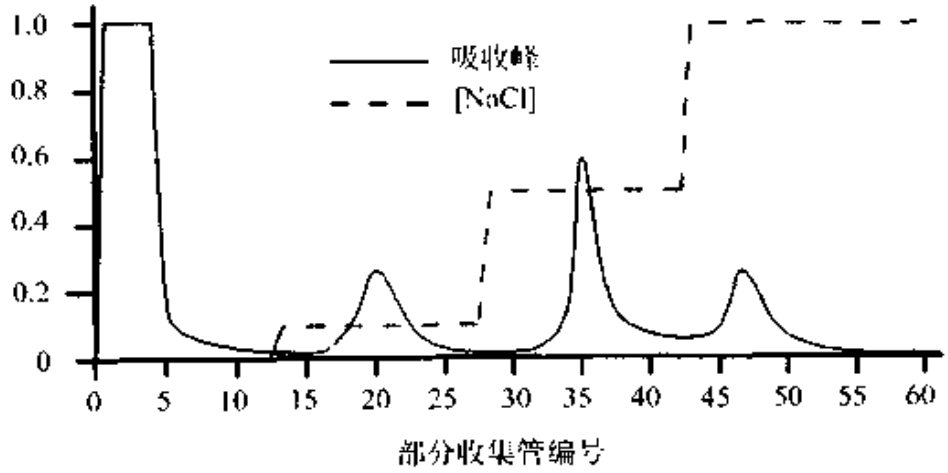


图 10.5　步进式洗脱的洗脱液吸光曲线

（2）梯度式洗脱

梯度式洗脱的洗柱缓冲液总用量应为树脂床体积的 5～10 倍。

1）将离子强度较低的洗脱液（20mmol/L Tris-HCl,

0.02mol/L NaCl）放在梯度仪离层析柱较近的一端，离子强度较高的洗脱液（20mmol/L Tris-HCl，1.0mol/L NaCl）放在另一端。装洗脱液的两个容器应该一样，溶器中的液面高度也须相同。确保梯度仪中没有气泡。开动低浓度洗脱液容器中的电磁搅拌器，将梯度仪装在层析柱上。

2） 用部分收集器收集洗脱液并检测其成分。

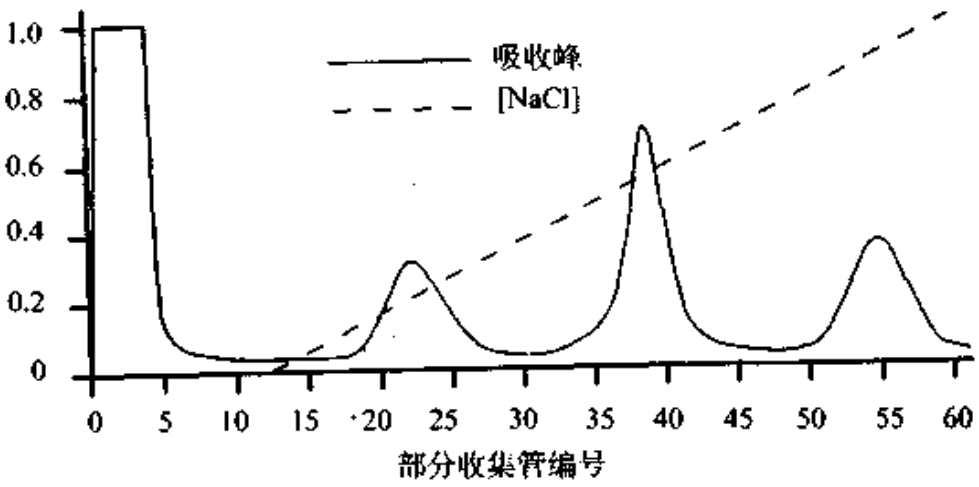


图 10.6　梯度式洗脱的洗脱液吸光曲线

10.1.2.6　离子交换树脂的再生和储存

使用过的树脂在储存前必须进行清洗和加入防腐剂。树脂的再生是指去掉在实验中最后与树脂牢固结合的物质使得树脂能再次使用。在不同离子强度溶液的溶胀效应影响下保持稳定的树脂可以直接在层析柱中再生，葡聚糖树脂（Sephadex）等在不同溶液中溶胀情况不同的树脂再生前应从层析柱中取出，之后再重新装柱。若在上次层析中树脂里积累了大量碎屑，也应从层析柱中取出再生。

高浓度的 NaCl 溶液（如 1-2mol/L 的 NaCl 溶液）可使大部分树脂再生。油脂等少数与树脂紧密结合的物质可用低浓度的碱

溶液（如0.1mol/L的NaOH溶液）或去垢剂（见表10.4）洗去。

表10.4　离子交换树脂再生用试剂

离子交换树脂	标准洗脱试剂	严格洗脱试剂
Sephadex	2mol/L NaCl溶液	0.1mol/L NaOH或非离子型去垢剂
DEAE Sephacel	2mol/L NaCl溶液	0.1mol/L NaOH或阳离子去垢剂
Sepharose	1mol/L NaCl溶液	0.5～2.0mol/L NaOH
Trisacryl	1～2mol/L NaCl溶液	0.1mol/L NaOH或非离子型去垢剂
Bio-Rex	0.5mol/L NaOH	

阴离子交换树脂可储存在0.002%洗必泰（双氯苯双胍已烷）缓冲溶液中。阳离子交换树脂可储存在0.005%硫柳汞缓冲溶液中。

注意：硫柳汞或其他重金属阳离子化合物与叠氮化合物混合会发生爆炸[6]。

一些树脂可通过高压灭菌抑制微生物的生长。

10.1.2.7　一些常见问题

（1）层析速度太慢

可能原因及解决方法：

- 关小层析柱出口，再打开。
- 若是气泡阻挡了洗柱缓冲液的流动，可通过增加柱压并用指甲轻敲柱壁的方法以除去气泡。确保在引入任何溶液时不要产生气泡。
- 树脂顶部出现沉淀物。此时应刮掉顶部1～2cm的树脂，换之以新的树脂。更加仔细的过滤蛋白质溶液或在层析时使用去垢剂。
- 树脂的支撑物发生粘连。在样品蛋白质损失量允许的情况下，支撑物应取出并清洗。
- 树脂被压紧。葡聚糖等随溶液离子强度变化而膨胀的树脂可能会发生这一现象。（见10.1.2.2离子交换树脂的

选择）

- 层析柱太细。对于性能较好的树脂，柱高只需为直径的两倍即可得到理想的层析效果。
- 细小颗粒堵塞了层析柱。
- 泵的连接管漏气。更换新连接管。
- 层析柱出口处管道堵塞，更换或清洗管道。
- 树脂中滋生微生物。（见 10.1.2.6 离子交换树脂的再生和储存）

(2) 蛋白质不与树脂结合

可能原因及解决方法：

- 初始上样缓冲液离子强度过大。降低初始上样缓冲液离子强度，还应仿照 10.1.1.2 上样缓冲液 pH 值选择试验进行离子强度的选择试验。
- 树脂 pH 值因解吸作用而发生变化。注意蛋白质等电点的计算值往往与实验值差别很大。
- 树脂未进行适当平衡。
- 再生的树脂未洗净。

(3) 纯化蛋白质的产率低

成功的蛋白质纯化产率应为 60%～80%，以下为产率过低的可能原因及解决方法：

- 树脂上的蛋白质未洗净。可采用增强溶液离子强度；更换活性高的反荷离子或使用去垢剂等方法解决。
- pH 值不合适。若缓冲体系的 pH 值与目的蛋白的 pI 值相差太远，目的蛋白与树脂的结合会过于牢固。
- 蛋白质发生沉淀。这可能是因为缓冲体系 pH 值过于接近蛋白质 pI 值；溶液离子强度过低或溶液过度稀释。
- 蛋白质在初步过滤时有损失。
- 蛋白质或辅助因子在层析时有损失。为确定这一点，需将各部分洗脱收集液集中后测蛋白质活性。
- 蛋白质水解酶破坏了目的蛋白。

- 树脂中有微生物滋生。

(4) 蛋白质分辨效果差

可能原因及解决办法：

- 层析时溶液流速太快。
- 层析柱过短。
- 上柱蛋白质过多。减少上样量。
- 梯度洗脱时洗脱液浓度变化太快。
- 蛋白质可在脱离层析柱后再次混合。尽量减少树脂支持物与部分收集器间的管道体积。
- 不均匀的装柱以至产生碎屑；上样和洗脱时的错误操作。
- 树脂未进行适当平衡。
- 树脂中有微生物滋生。

(5) 蛋白质洗脱的重现性差

可能原因及解决办法：

- 层析柱的平衡不彻底。
- 洗脱液的离子条件或 pH 值不一致，这对梯度洗脱的影响尤其大。
- 蛋白质发生沉淀。彻底清洗层析柱，去除任何可能导致蛋白质沉淀的杂质，过滤蛋白质溶液。
- 蛋白质在储存时变性。重新测定蛋白质活性，必要的话改变蛋白质储存条件。

(6) 纯化时蛋白质失活

可能原因及解决办法：

- 某个辅助因子或一部分蛋白质有损失。混合部分收集液，测定活性。
- 蛋白质在现有层析液中不稳定。
- 树脂中滋生的微生物破坏了蛋白质。

(7) 蛋白质活性高于纯化前

可能原因及解决办法：

- 测定条件发生改变
- 某中抑制剂在纯化时被去掉了。可混合部分收集液，测定活性以确定这一点。

10.2 蛋白质溶液的浓缩

离子交换层析可用于浓缩蛋白质溶液。因为大多数蛋白质的等电点均低于8，所以它们可在pH值为8的弱离子强度溶液中被阴离子交换树脂吸附。用离子强度大的溶液可简单的将它们洗脱下来，达到浓缩的目的。批量层析是浓缩蛋白质溶液有效的手段。一般离子交换层析浓缩的回收率可达60%～80%，与硫酸铵沉淀法相当。超滤法浓缩的回收率则可达到95%。以下为离子交换层析浓缩蛋白质的步骤：

1) 准备离子交换树脂，装配层析柱，或采用批量层析。1ml树脂可浓缩20mg蛋白质；
2) 用20mmol/L Tris-HCl（pH8.0），20mmol/L NaCl溶液平衡树脂；
3) 加入样品；
4) 使两倍于树脂体积的20mmol/L Tris-HCl（pH8.0），20mmol/L NaCl溶液流过树脂；
5) 用20mmol/L Tris-HCl（pH8.0），1mol/L NaCl溶液洗脱蛋白质。

10.3 批量层析

批量层析的特点在于层析用树脂不放在柱中，而是放在烧杯或瓶子的容器中；通过搅拌或摇动而混匀层析；以过滤或离心的办法分出层析液。此法简单快速，适用于对蛋白质分辨率要求不高的情况。也是浓缩蛋白质的有效手段。

1) 在烧杯或锥形瓶中平衡树脂，不断搅拌以促进平衡；
2) 倾泻掉大部分溶液，保留的溶液量要使树脂能轻松的搅拌；

3）加入样品；

4）放置 1h，使蛋白质与树脂充分结合，中间须搅拌几次；

5）过滤树脂，注意不要使树脂脱水；

6）用原始溶液在滤器上轻柔的润洗树脂；

7）将树脂重新放入烧杯中，用离子强度大的溶液处理；

8）过滤树脂，检测洗脱液中是否含有蛋白质；

9）若有必要，用离子强度更大的溶液处理树脂，直至目的蛋白被洗出。

参 考 文 献

[1] Giri, L. 1990. Chromatofocusing. Meth. Enzymol., 182: 380~392.

[2] Gorbunoff, M. J. 1990. Protein Chromatography on Hydroxyapatite Columns. Meth. Enzymol., 182: 329~339.

[3] Li, C. M. and T. W. Hutchens. 1992. Chromatofocusing Meth. Mol. Biol., 11: 237~248.

[4] Pharmacia LKB Biotechnology. 1991. Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods. Sweden: Uppsala.

[5] Harris, E. L. V. and S. Angal eds. 1989. Separation Based on Structure. Protein Purification Methods: A Practical Approach. New York: IRL Press.

[6] Rozycki, M. and R. Bartha. 1981. Problems Associated with the Use of Azide as an Inhibitor of Microbial Activity in Soil. Appl. Env. Microbiol., 41: 833~836.

[7] Scopes, R. K. 1994. Protein Purification: Principles and Practice, 3rd ed. New York: Springer-Verlag.

李 镭 汪家政

第十一章　凝胶过滤层析

11.1　蛋白质的纯化

11.1.1　引　　言

凝胶过滤层析是一项重要的蛋白质纯化技术，又称为大小排阻、凝胶排阻、分子筛或凝胶过滤层析[7,9]。这种方法利用分级分离，而不需要蛋白质的化学结合，这就明显降低了因不可逆结合所致的蛋白质损失和失活。另外，可利用此法更换蛋白质的缓冲液或降低缓冲液的离子强度（见 11.2）。

在蛋白质纯化操作中何时使用凝胶过滤，还不能一概而论，有时纯化到某一步时适用凝胶过滤。

纯化一个分子量较大的蛋白（例如：超过 100KD），纯化的第一步可使用凝胶过滤层析，选用适当的柱填料，可使目的蛋白出现于收集液的前面部分，而所有的小分子量蛋白质仍保留在柱上，这样就完成了一步纯化。如果已采用了离子交换层析部分纯化蛋白质，那么凝胶过滤是下一步的理想纯化方法，因为这两种分离方法在原理上互补。

选择窄分离范围的填料分离分子量相近的蛋白质可以得到一个较好的分离效果；而分离一个分子量未知的蛋白，则需要一个宽分离范围的填料。对于一个高纯度的蛋白质，可以用凝胶过滤层析检测它的活性形式是单体还是寡聚体。总之凝胶过滤是一个可用于蛋白质纯化任何一个阶段上的分离方法。

11.1.1.1　凝胶过滤的原理

凝胶过滤层析是根据蛋白质分子大小不同而达到分离效果

的，凝胶过滤填料中含有大量微孔，只允许缓冲液及小分子量蛋白质通过，而大分子蛋白质及一些蛋白复合物则被阻挡在外。因此，高分子量的蛋白质在填料颗粒间隙中流动，比低分子量蛋白更早地被洗脱下来（见图 11.1）。最大的蛋白质分子最早流出柱子，因为它们在到达柱底前经过的体积最小。中等大小的蛋白质可以进入填料分子中较大的孔内，因此它们晚一些到达柱底，而小蛋白质可以进入所有填料的孔内，有最大的通过体积，故最后到达柱底。

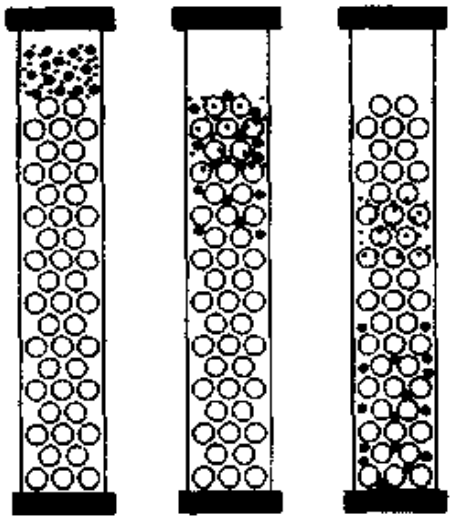


图 11.1　凝胶过滤层析的框架示意图。其中空心圆圈代表凝胶，实心圆圈表示蛋白质

溶质分子在移动相（洗脱剂）和固定相（凝胶相）之间的分配系数 Kd 来表示凝胶过滤层析的特性。

$$Kd = \frac{Ve - Vo}{Vi}$$

Ve 为某一成份从层析柱内完全被洗脱出来时洗脱液的体积；Vo 为层析柱内凝胶颗粒之间空隙的总容积，Vi 为层析柱内凝胶颗粒微孔的总容积，Kd 为蛋白质在洗脱剂和凝胶之间的分配比。凝胶层析符合层析的基本方程式。

在蛋白质纯化方法中选择凝胶过滤分离的指标必须明确，这些指标应该是对蛋白质的高分辨率，最短的层析时间，低样品损耗（尤其在用于分析时）或高回收率。根据这些目的可选择适当的层析装置。如果主要目的是达到不同大小蛋白质的最大限度的分离，凝胶层析柱必须细而长。为了高分辨率，柱高应该是柱直径的 20～40 倍。由于蛋白质不会结合在填料上，这个比例适合于凝胶过滤的要求。

有必要进行预实验比较分离效果不同的各种类型柱填料。另外，细小颗粒填料和较低的流速有助于得到好的分离效果。然而，如果速度是首要因素，则分辨率必须作出让步，或者仔细选择一种具有相对高分辨率和相对高流速的树脂。

如果用凝胶过滤层析进行小量样品的分析时，应考虑使用自动化高分辨率系统，如 pharmacia SMART™，如果要求好的重复性，推荐使用预装柱和自动层析系统。

凝胶过滤层析还可用于以下几个方面：

（1）分子量测定

蛋白质经过层析柱时，一般情况下不会与填料产生任何物理作用，因此可以用凝胶过滤来测定蛋白质的分子量。然而，用此法测定蛋白分子量的样品必须是球蛋白，这是因为分子量标准品本身大多是球蛋白。如果一种杆状蛋白从凝胶间隙被洗脱下来，测得的分子量要高于其实际值；如果杆状蛋白进入了树脂的微孔内并且被压缩，测得的分子量则低于其实际值，因此非球形蛋白用此法测量分子量受到了限制。

为了排除蛋白质几何形状对分子量测定的影响，一般策略是在层析前用盐酸胍或尿素处理使蛋白质在变性条件下[3]，蛋白质的三级结构变成无规则的卷曲状，这样测得的分子量更有代表性。可是有关寡聚体的亚基数目的信息将无法得知。

（2）去除低分子量的杂质

用凝胶过滤层析可以快速分离不必要的放射性物质，水解蛋白碎片，辅助因子或低分子量蛋白（见 11.2）。

（3）从二聚体和其他寡聚体中分离目的蛋白

（4）更换蛋白质的缓冲液

如果选择一种完全排阻目的蛋白的树脂，那么这一蛋白质可被洗脱进入一种新的缓冲体系（见 11.2）。首先在蛋白上样前，将柱子用新的缓冲液简单平衡。这个程序也可用于蛋白质的脱盐。使高离子强度缓冲体系中的蛋白质交换到低离子强度缓冲体系中去。这常在蛋白质进行离子交换柱层析前使用，或用于蛋白质在高盐缓冲液中活性下降的情况下。

（5）研究蛋白质与配基的结合[1,4]

11.1.1.2 样品分离操作

一个适合于凝胶过滤层析分离主要步骤的样品例如：一个分子量为 50kD$_a$ 的蛋白质使其溶解后体积为 2ml，浓度为 5mg/ml，并且在 pH8.0 的 Tris 缓冲液中稳定。

（1）选择填料

根据蛋白质的分子量，选择具有相应分离范围的凝胶，例如，对于一个 50kD$_a$ 的蛋白质，可以选择 Sephacryl S-200 树脂（表 11.1），这种树脂的分离范围是 5kD$_a$～250kD$_a$，这个范围恰好适合于 50kD$_a$ 蛋白质。另外，如果 50kD$_a$ 蛋白质是以双体或寡聚体形式存在，也可用同一树脂得到分离（见 11.1.1.3）。

（2）确定层析柱的尺寸

在层析前必须计算所需填料的体积以及柱子的几何形状。一般分析分离或分级分离的上样量是柱床体积的 1%～5%。而组别分离和有些分级分离能获得较好分辨率，样品用量可以增加。例如，脱盐及缓冲体系更换时，上样量可为柱床体积的 15%～20%。根据样品的

上样量，计算装柱所需填料的量，如果以2%的柱床体积加2ml样品，则需要100ml树脂，为了得到一个好的分离效果，柱高应是柱直径的20～40倍。因此，将100ml树脂装入一个直径为1.5cm柱中时，柱高应为56cm左右。计算方法为：体积$=\pi r^2h$，100ml$=100cm^3$$=\pi\times(0.75cm)^2\times h$。层析柱细长，会产生管壁效应，而且流速慢，柱太粗又易使样品稀释，而且达不到应有的分离效果。Scope（1994）[8]提出了一个计算柱直径的公式：

柱直径$=(m/10cm)^{1/3}$其中m是蛋白的质量（mg）

柱的长度＝柱直径×30

表11.1　可利用的商品化凝胶过滤填料

出品厂商	名　称	凝胶类型	分离范围（kDa）	流速*（cm/h）
Bio-Rad	Bio-Gel P-6DG	聚丙烯酰胺	1～6	15～20
	Bio-Gel P30	聚丙烯酰胺	25～40	6～13
	Bio-Gel P60	聚丙烯酰胺	3～60	3～6
	Bio-Gel P100	聚丙烯酰胺	5～100	3～6
	Bio-Gel A-5m	琼脂糖	10～5000	7～25
	Bio-Gel A-15m	琼脂糖	40～15 000	7～25
	Bio-Gel A-50m	琼脂糖	100～50 000	5～25
pharmacia	Sephacryl S-100HR	X-链葡聚糖/双丙烯酰胺	1～100	20～39
	Sephacryl S-200HR	X-链葡聚糖/双丙烯酰胺	5～250	20～39
	Sephacryl S-300HR	X-链葡聚糖/双丙烯酰胺	10～1500	24～48
	Sephadex G-25	葡聚糖	1～5	2～5
	Sephadex G-50	葡聚糖	1.5～30	2～5
	Sepharose CL-6B	交联琼脂糖	10～4000	30
	Superdex 75	琼脂糖	3～70	7～50
	Superdex 200	葡聚糖	10～600	7～50
	Superose 6	交联琼脂糖	5～5000	30

*cm/h＝ml/h.cm^2柱截面积，表中所引用的流速是推测值。

（3）选择实验用的缓冲液

选择相应的缓冲液，其 pH 值、离子强度以及所含的还原试剂，必要的辅助因子都要有利于蛋白质的稳定。一般中等离子强度的缓冲液有助于消除蛋白质与凝胶可能产生的相互作用，但有时为了某些特殊目的，可使用高浓度变性剂（如 8mol/L 脲等）作为缓冲液进行蛋白质的分离。

(4) 安装层析装置

有关凝胶过滤层析装置的组成见 11.1.2.1，按图 11.2 安装。

(5) 制备凝胶并装柱

见 11.1.2.2 节关于柱层析的准备工作说明。

(6) 层析

见 11.1.2.3 节如何上样及向层析柱内加入缓冲液

(7) 检测蛋白质分离的组分

按照目的蛋白的特性，采用活性检测、免疫学分析或分子量测定等方法需要对所分离的组分进行检测，酶活力测定是蛋白质纯化中最常用的、专一性强的检测方法；免疫印迹法是通过抗体来检测蛋白质的，它比活性测定易产生误差，应用时应注意；SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）可用于蛋白质分子量的测定，通过电泳分析可以减轻繁重的检测量及缩小测活范围。

(8) 结果分析

层析过程中，如果蛋白质洗脱峰出现在早期，似乎很尖锐，但免不了混有附近的杂蛋白峰；相反，在凝胶过滤后期洗脱下的蛋白质峰虽然较宽，但可以有较好的分辨率。

11.1.1.3 凝胶过滤层析的填料

1) 前面曾提到层析实验确定的指标会影响填料的选择，但主要应根据被分离蛋白质的分子量选择凝胶过滤填料。

目的蛋白分子量应该在填料分级范围的中间（参考表11.1）。选用窄范围树脂将会得到更好的分辨力，然而对于一个未知蛋白，则应选用宽范围的凝胶（例如：Sephaeryl S-300）。每一种型号的凝胶具有一定的选择曲线，它表示了溶质分离的分子量范围。以葡聚糖凝胶G-25为例，它分离的分子量范围为100～5000Da，凡分子量大于5000的溶质（$Kd=0$）是全排阻，最先从外水中洗出；而分子量在100～500的溶质（$Kd=0\sim1$）可在凝胶粒子内不同程度地自由出入，依照分子量大小程序流出柱外；分子量小于100的溶质（$Kd=1$）完全进入粒子内，最后流出。凝胶型号的选择还要考虑是组别分离还是分级分离。将低分子量和高分子量的物质分离的组别分离，要使高分子量物质完全被排阻（$Kd=0$），小分子物质完全渗入凝胶内（$Kd=1$）。例如，分子量在30000～50000Da的蛋白质脱盐，可用葡聚糖凝胶G50或G25；而小肽低分子量物质（1000～5000Da）的脱盐，可用葡聚糖凝胶G-10和G-15。分离分子量比较接近的几种物质的分级分离，更应仔细考虑各种凝胶的选择曲线。例如，将纤维素部分水解，然后利用交联葡聚糖凝胶G-25可以分离出1～6个葡萄糖单位的纤维素糊精的低聚糖，它的分子量范围为180～990Da，恰在交联葡聚糖G-25（100～5000Da）工作范围之内。利用凝胶层析测定分子量时，应使用测定样品的分子量分布在凝胶选择曲线的线性范围内，并在标准分子量曲线的中间。此外，同种凝胶的各类型号，其选择曲线互相重叠。也就是说，同时有几种型号可以供选用时，一般应选用排阻极限比较小的。这样，样品易于洗脱，能改善大分子样品的回收，凝胶刚性较强，有较快的流速。

层析凝胶的选择还应根据分离样品和洗脱剂的性质以及操作条件而定。例如，凝胶层析常用一些去垢剂增加某

些蛋白质（如膜蛋白）在水溶液中的溶解度，有时候测定分子量也要用到去垢剂，而去垢剂又会使蛋白质结构松散。因此，应选用孔径比预计大一些的凝胶（如 Sephacryl S-200，Sephacryl S-300 以及 Sepharose CL-6B 等）。

2）凝胶过滤填料通常有三种：交联葡聚糖、聚丙烯酰胺和琼脂糖珠。葡聚糖和聚丙烯酰胺适合于分离小到中等分子量的蛋白质，而琼脂糖填料具有较大的孔，可用于分离较大的蛋白质复合物。有些琼脂糖填料在压力作用下可被压缩。因此，在应用蠕动泵时要格外小心操作。

3）在选择凝胶过滤填料时还要考虑填料的流速，流速快，分离过程也快；而流速慢能够得到分辨率好的峰。有不同粒度（粗、中、细）的填料可供研究者在衡量速度和分辨率的关系时自由选择。粗颗粒填料有较高的流速，而细颗粒填料有较好的分离效果。至今从未出现过分离效果好的填料在不降低分辨力的情况下而提高流速的情况。

11.1.2 方　　法

11.1.2.1 设　　备

凝胶过滤层析的主要设备（见图 11.2），只需要一根柱子经一根导管与分部收集器相连。一个向层析柱加缓冲液的自动存贮器，一台通过加压调节缓冲液流速的蠕动泵，还有一台紫外检测器和一台记录仪，以解决所有含蛋白质收集液的检测和记录之需。

更为复杂的整体层析设备已经商品化，研究人员可以根据蛋白质分离的要求选购所需设备。由于标准的凝胶过滤层析运行时间较长，经常在 12h 以上，所以如果纯化蛋白质的时间有限，则可选择高压层析系统。然而标准的层析系统最常用而且在大多数情况下，可以得到很理想的结果。本章将围绕蛋白质纯化实验室

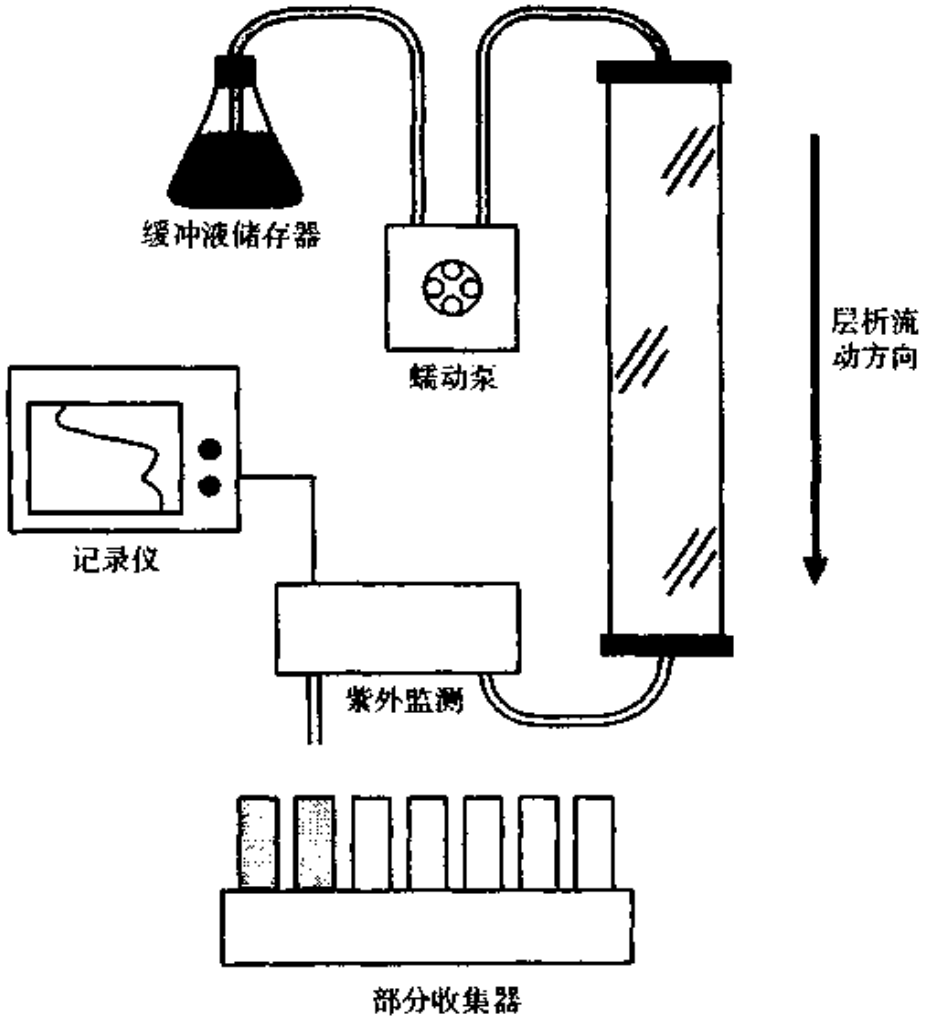


图 11.2　凝胶过滤层析设备

常用的标准“低压”层析系统及方法进行讨论。

(1) 层析柱

凝胶过滤柱带有一个多孔支撑滤片，滤片下的“死体积”大时，被分离组分之间重新混合的可能性就大，其结果会影响洗脱峰形，出现脱尾现象，降低分辨力。精确分离时的“死体积”不能超过总柱床体积的 0.1%，可用玻璃珠填满支撑滤片下的空间或尽可能缩短接头以减少“死体积”。

(2) 连接导管

连接凝胶过滤层析各部分的导管应该有一定柔韧度，一

般常用 Teflon、Tygon 和硅橡胶管。

(3) 分部收集器

插有收集管的自动分部收集器对准层析柱的出口处，洗脱液经分部收集器分管收集，若按分部性质来分，有记时、记滴、记重和固定体积等。

(4) 缓冲液贮存器

存贮器中存放着洗脱缓冲液，并经导管与层析柱相连。它可以是一个烧杯，或一个瓶子。

(5) 蠕动泵

蠕动泵用来调节缓冲液流经层析柱时的速度，因为凝胶可以承受一定的压力，所以用蠕动泵来加快流速。

(6) 紫外监测仪

紫外监测仪直接连在层析柱出口处，当波长为 280nm 时，洗脱液经过监测仪时，可以直接检出蛋白质峰，而峰的形状被记录仪描绘出，节省了手工检测每管收集液的蛋白含量所需的时间和人力。

(7) 记录仪

记录仪打印出紫外监测仪测出的吸收峰。

11.1.2.2 凝胶的填装

(1) 凝胶的溶胀

如果凝胶是脱水的干粉（例如 Sephadex）在使用前需要溶胀。

1) 一份凝胶加 10 份的缓冲液，原则上应将凝胶颗粒放入洗脱缓冲液中。

2) 在摇床上或手动搅拌混合，避免使用电力搅拌器。因为机械搅拌力会导致凝胶颗粒破裂成碎片，这些细小的碎片将干扰层析。如果出现细小的凝胶碎片可将凝胶浆悬浮，待凝胶颗粒沉降后，去除上清，重复几次，直到液相不再混浊为止。

3） 自然溶胀需要 24h 至数天，为了加速溶胀，可用热法溶胀。即在沸水浴中将凝胶浆逐渐升温至近沸，这样可加速溶胀平衡，通常 1～2h 即可完成。这种方法不但省时，还可以排除气泡和消毒。

4） 无论凝胶是否需要溶胀，为了防止气泡影响层析，需用水泵或真空泵对凝胶浆抽气 1h。

（2）装柱

1） 将层析柱垂直安装在无直接光照、无空气对流处，以防止由于温度变化使层析柱内产生气泡。通常放在专用的层析冷柜中；

2） 装柱前取 3/4 体积的凝胶和 1/4 体积的缓冲液制成凝胶浆；

3） 对于经常使用的层析柱，建议使用一个商品化的流动相接头（flow adaptors）。它对柱床表面有保护作用，还可以避免样品中的大颗粒混入凝胶中，从而延长层析柱的寿命；

4） 将缓冲液加入层析柱，当有缓冲液流出时关闭柱的出口。这样可以排除层析柱中支撑滤片以下空隙中的气泡；

5） 沿柱子一侧或沿一根玻璃棒倾入凝胶浆，必须一次完成，否则柱床不均一；尤其要注意在装柱过程中不要产生气泡，如果在装柱早期出现气泡，可用一玻璃棒搅动，使气泡排出；

6） 当凝胶装到柱底之后，打开柱底出口以加快装柱进程，随之加入更多的缓冲液；

7） 将层析柱与蠕动泵和贮液器相连接，用几倍柱床体积的缓冲液洗涤层析柱，以使其稳定和平衡；

8） Sephacryl HR 和 Superose 凝胶以不同的流速分两步装柱（详见使用说明书）；

9） 注意任何时候都不得使层析柱缓冲液流干，这样就不能

进行正常层析分离了。

(3) 层析床的检查

因为气泡和层析柱的不均一性会明显降低层析分辨，所以在层析前必须仔细地检查层析床的均匀性。

1) 用眼对光观察层析柱有无气泡和裂纹。

2) 用 2mg/ml 蓝色葡聚糖溶液进一步精确检查层析床的均匀性。用量为柱床体积的 1%，两倍用量的洗脱液即可将蓝色洗脱下来。常用洗脱液为 0.02mol/L 氯化钠。如果连接实验时，必须避免盐的存在，则可再用水洗脱。若微量的蓝色葡聚糖吸附于凝胶表面时，常用血清白蛋白溶液洗脱。

蓝色葡聚糖的蓝色是显而易见的，如果柱子装的好，可见到蓝色区带均匀平稳地通过凝胶，而不留任何条纹。如果是 Bio-Gel P 柱，也可用血红蛋白和铁蛋白代替蓝色葡聚糖作为检查用的标准参照物。因为它们也是有色蛋白。蓝色葡聚糖也可用于测量层析柱的外水体积，外水体积是指不能进入凝胶中的任何微孔的大颗粒物质从柱上洗脱下来的所需的洗脱液体积，外水体积是蛋白质可能从柱上被洗脱下来的最小必需体积，它可以作为预测其他蛋白质所需洗脱液用量的相对标准。

11.1.2.3 样品上柱及洗脱

(1) 样品上柱

1) 蛋白质样品应该高度浓缩（10～20mg/ml），体积应尽量小（适当的上样量为柱床体积的 1%～5%），上样量高于柱床体积的 5%，则将降低分离效果。而低 1% 的柱床体积并不提高分离效果，此外样品黏度不能太高，否则会使层析区带不稳定和流速无规律，导致区带变宽或歪曲。

2) 上样前，样品须经孔径内 0.2μm 的滤膜过滤或在

10000×g 离心 5min，以除去干扰层析的残渣。

3） 选择的缓冲液应该有利于蛋白质活性的保持并可防止非特异的蛋白质之间或蛋白质与凝胶之间的相互作用。一般低离子强度的盐溶液（20～100mmol/L），足以阻断非特异的离子间相互作用。在某些情况下，蛋白质与凝胶之间会产生疏水性相互作用，这时不应该用高离子强度的盐溶液。

- 层析柱经平衡后，待平衡液流至床表面以下 1～2mm 时，关闭出口。不允许流干，柱干后必须重装；
- 用加样器将样品加至柱床表面以上 2～3cm 时，接上恒压样品瓶，并打开出口，使样品渗入胶内。样品加完后，用小体积的洗脱液洗表面 1～2 次，尽可能少稀释样品。当样品接近流干时，像加样品那样仔细地加入洗脱液，至床表面以上 2～5cm 时，即可接上恒压洗脱瓶开始层析。以上所有操作步骤都须时刻注意层析表面的均匀性。

注意：

①加样时不能用一般滴管，要用下口较大的滴管，以免滴管头所产生的压力搅混柱床表面。

②加样操作要熟练而仔细，避免搅混柱床表面。在平衡时柱床表面常常会出现凹陷现象，因此必须检查柱床表面是否均匀，如果不符合要求，可用细玻璃棒轻轻搅动表面层，让凝胶自然沉降，使表面均匀。

③加样品的方法是利用两种液体比重不同而分层的原理，将高比重样品加入床表面低比重的洗脱液之中，样品就缓慢均匀地下沉于柱床表面，再打开出口，使样品渗入层析床。如果样品比重不够大时，可在样品中加入葡萄糖或蔗糖使其终浓度达 1%。

（2）样品洗脱

1） 缓冲液流经层析柱进行洗脱直至目的蛋白被检出为止；

2） 通常用蠕动泵控制层析柱的流速，使用泵的压力不要超过凝胶的耐受程度；

3） 由于凝胶过滤层析经常需要进行数小时以上，为了避免

层析柱流干，在不使用蠕动泵时，可在贮液瓶与层析柱上端入口人加一根软管其长度与柱的出口处持平，使缓冲液先流经软管再到达柱内（图 11.3）；

4） 理想的样品回收率可高达 85%以上；

5） 低流速可提高峰的分辨力；

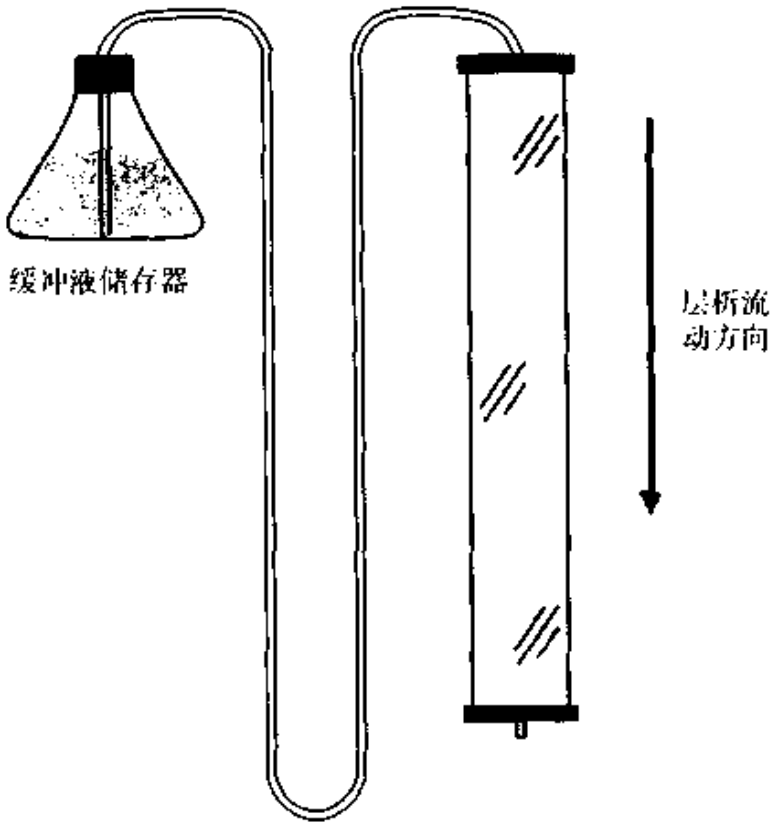


图 11.3　避免层析柱流干的连接管示意图

6） 关于蛋白质分子量测定（主要是非变性条件下的球蛋白）可以通过对蛋白质标准品的凝胶过滤柱层析来解决。但此法不能用于变性条件下的分子量测定。用标准蛋白的洗脱体积对其分子量的对数作图得到一条标准曲线。用未知蛋白的洗脱体积到标准曲线上可查出相应的分子量[2]。

11.1.2.4 层析柱的再生与保存

由于凝胶不可能与蛋白质结合，因此从凝胶上除去蛋白质不是一件难事。通常用稀的氢氧化钠或非离子型去垢剂清洗可除去大部分的结合物质（见表 11.2）。然而避免层析柱污染的最有效方法是进样前将样品过滤以及用新过滤的缓冲液进行层析。

表 11.2 一些凝胶过滤填料的再生

凝胶种类	再生处理
Bio-Gel P	3% H_2O_2
Bio-Gel A	0.01%二乙基碳酸盐
Sephacryl HR	0.2～0.5mol/L NaOH或非离子型去垢剂
G-type Sephadex	非离子型去垢剂或0.2mol/L NaOH
Sepharose CL	0.5mol/L NaOH或1%非离子型去垢剂
Superose	0.1～0.2mol/L NaOH

如果经过以上标准程序洗涤，某些污染物仍不能清除时，可从柱中倒出树脂，按下述方法进行特殊处理后，再重新装柱。用24%乙醇或30%乙腈对层析柱洗脱过夜可除去疏水蛋白；用30%～50%乙酸洗脱或用1mg/ml胃蛋白酶（溶于0.5mol/L NaCl和0.1mol/L乙酸）将层析柱内凝胶孵育过夜可去除亲水蛋白。用蛋白水解酶处理可分解凝胶中剩余的痕量胃蛋白酶。用TE缓冲液（10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA pH8.2）洗涤或用核酸酶处理可去除核酸。层析柱用非离子型去垢剂如：0.2%～1% NP-40或Lubrol洗脱过夜可洗去脂类物质。

层析柱须保存于含防腐剂的缓冲液中并放置在低温环境下，这样有助于防止微生物滋生。通常在缓冲液中加入0.02%叠氮钠可防止微生物生长。Sephacryl HR或Sepharose CL可用20%乙醇保存。有些凝胶可采用高压灭菌防止微生物生长。

11.1.2.5 讨　论

以下列举了在凝胶过滤层析中常出现的一些问题以及解决方法：

（1）层析柱的流速低

- 柱出口处于关闭状态，打开出口即可。
- 管中有气泡限制了洗脱液的流速。增加柱压清除气泡，并用手指轻弹管壁。采用脱气的缓冲液和凝胶可以排除气泡。另外，在装柱时要小心。
- 连接管堵塞。这时要停止洗脱，更换连接管。有时可以在洗脱液中加去垢剂来清除阻塞物，如果还不能解决就需重新装柱。
- 有沉淀物聚积在凝胶的顶部，可直接刮去凝胶表面，去除残留物，再用玻棒将 1～2cm 深的凝胶轻搅，并使其自然沉降。在层析前最好将样品过滤，或洗脱时加去垢剂。
- 凝胶被压紧了，或溶胀不完全，或含有较多的粉沫，这时需要重新装柱。
- 仔细检查连接管上是否有漏洞，必要时须更换新管。
- 凝胶中有微生物污染，应使用一支新柱子。

（2）异常峰形

- 样品上柱不良，可用蓝色葡聚糖凝胶练习操作。
- 蛋白质被吸附在凝胶上（尤其是拖尾），还可能因为缓冲液中盐的离子强度较高或含有某些去垢剂。有时蛋白质的疏水作用也会使峰形异常，这时需要降低盐的离子强度。

（3）蛋白质峰分辨力差

- 层析柱太短，柱的分辨力与柱长的平方根成正比。
- 洗脱液流速太快，流速高分辨力低。
- 柱底死体积较大，在柱底与分部收集器之间被洗脱的蛋

白质又重新混合。

- 样品体积太大，样品比例占柱床体积 1% ～5%时，分辨力最好。
- 层析柱填装不好，致使缓冲液流动异常而降低分辨力。
- 选错了凝胶类型，每一种凝胶都有其适应的分离范围。选择窄范围的分离胶会取得好的分辨力。值得注意的是，非球蛋白和变性蛋白与同分子量的球蛋白的洗脱峰有不同的特征。
- 选择的凝胶粒度不合适。细颗粒凝胶在延长洗脱时间的情况下能得到高分辨力。

(4) 样品回收率低

- 样品发生沉淀。缓冲液中盐浓度无效或过高都能使蛋白质沉淀。必须保证在实验条件下蛋白质完全溶解。
- 在上柱前样品已经丢失。如果蛋白质溶液在上柱前通过离心或过滤被澄清，那么在进样前要检测其回收率。
- 蛋白质被吸附在凝胶上（见方法 2 第 2 条）。
- 洗脱条件不当，致使蛋白质亚基解离或使重要的辅助因子释放出。将丢失的各组分与蛋白质重新混合可使蛋白质复性。
- 蛋白质水解，可在缓冲液中加入蛋白酶抑制剂（见第一章）。
- 凝胶中有微生物滋生（见方法 1 第 1 条）。

(5) 洗脱峰不能重复

- 实验条件与前一次实验不完全一致。
- 样品发生沉淀（见方法 4 第 1 和第 2 条）。
- 在保存过程中样品发生变化，须重新测定蛋白质的活性，必要时改变保存条件。

(6) 蛋白质失活

- 辅助因子或蛋白质复合物部分缺失，可重新混合各组分检测活性。

- 在实验缓冲液中蛋白质不稳定，考虑改变缓冲液。
- 凝胶中滋生微生物使蛋白质变性（见方法 1 第 7 条）。

11.2 更换蛋白质的缓冲液

凝胶过滤层析是一个温和而又快速的转换蛋白质缓冲液的方法。凝胶过滤常用于脱盐中将蛋白质转移到一种低离子强度缓冲液中（例如硫酸铵沉淀中或离子交换层析中收集的峰）。还有小分子量的杂质像未结合的放射性同位素或核酸也能快速从溶液中除去。

此法利用一些凝胶可将所有蛋白质排阻于微孔之外的特性，因此，在用缓冲液洗脱之前蛋白质已出现在层析柱的预平衡缓冲液当中，或者说小分子的杂质进入了柱体积中。由于蛋白质与柱中的凝胶没有相互作用，也就不会发生超滤中蛋白质变性的危险（第四章）。采用凝胶过滤更换蛋白质的缓冲液要比透析法快速，但不可能像透析那样彻底脱盐。

注意：

①蛋白质浓度应低于 30mg/ml，样品体积可以是柱床体积的 20% ~ 30%。在去除高浓度缓冲液组分时，样品体积相对要小。短而宽的柱子可以达到快的流速。

②用低分子量范围的凝胶装柱，如 Sephadx G25（细颗粒）或 BioGel P-6DG

③层析柱平衡缓冲液即为蛋白质欲更换的缓冲液。

④样品上柱并洗脱。

⑤由于蛋白质比任何缓冲液通过都快，因而选用洗脱缓冲液并不重要。

目前预装凝胶过滤柱已商品化，用这种层析柱更换蛋白质溶液的缓冲液在几分钟内可更换 0.1ml。

参 考 文 献

[1] Ackers, G. K. 1973. Studies of protein ligand binding by gel permeation techniques. Meth. Enzymol., 27: 441 - 455.

[2] Andrews, P. 1965. The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96: 595 - 606.

[3] Ansari, A. A. and R. G. Mage. 1977. Molecular-weight estimation of protein using Sepharose CL-6B in guanidine hydrochloride. J. Chrom., 140: 98 - 102.

[4] Hummel, J. P. and W. J. Dreyer. 1962. Measurement of protein-binding phenome-

na by gel filtration. Biochem. Biophys. Acta, 63: 530～532.

[5] Chabers, J. A. A. and D. Rickwood eds. 1993. Chromatographic separation media. Biochemistry LabFax. San Diego: Academic Press.

[6] Pharmacia, L. K. B. Biotechnology. 1991. Gel Filtration: Principles and Methods. Sweden: Uppsala.

[7] Harris, E. L. V. and S. Angal eds. 1989. Separation on the basis of size: Gel permeation chromatography protein purification methods: A Practical Approach.. New York: IRL Presds.

[8] Scopes, R. K. 1994. Protein Purification : Principles and Practice, 3rd ed. New York: Springer-Verlag.

[9] Stellwagen, E. 1990. Gel Filtration. Meth. Enzymol., 182: 317～328.

戚海青　汪家政

第十二章　亲和层析

12.1　引　　言

亲和层析是一类纯化方法，它包含各种各样的形式，但其共同特征是均以蛋白质和结合在介质上的配基间的特异亲和力为工作基础。配基可以是生物学特异的，例如一个肽、一个抗体、一个底物、一个抑制剂、一个辅酶或一个核酸等；配基也可以是具有相对特异相互作用的凝集素、染料或疏水分子等。很多情况下，蛋白质和某些生物大分子的生物学功能在于它们能够特异地和可逆地与相应配基相互作用。如酶与底物、产物、抑制物、辅酶结合；抗体与相应的抗原结合；基因与互补核酸和阻遏蛋白相互作用等等。亲和层析就是利用这种相互作用来分离纯化的。亲和层析的主要过程简述如下：通常是在载体（无机或有机介质）表面先键合一段间隔臂，再连接上配基。间隔臂的作用是减少待纯化蛋白质（或其他生物大分子）与其相应配基结合时的空间位阻。这种固相化的配基将只能与其有生物特异亲和性的蛋白质分子相互作用而吸附，没有这种作用的其他生物分子不被吸附而流出层析柱。然后，改变流动相条件将吸附的蛋白质洗脱下来，于是达到分离纯化的目的。所以说，亲和层析选择性强、纯化效率高，常常可以一步获得满意的纯化效果。因为它应用的是生物学特异性而不是依赖于物理化学性质，故非常适用于分离低浓度的待纯化蛋白质。

第二部分首先概述了亲和层析需要的基本条件，如亲和柱的制备等；其次讨论了非特异洗脱的策略。第三部分讨论了更多的特异亲和层析方法。本章列出的参考文献将帮助读者深入了解亲和层析。

在所有的亲和纯化中，最有效的策略是结合目的蛋白到一个固定相，然后用该蛋白的特异洗脱剂（如底物、肽、辅助因子等）解离它。由于亲和相互作用的特异性和温和性，通常纯化在短时间可获得满意结果。也就是说，较快地获得高纯度、高活性的目的蛋白。在配基-蛋白质相互作用的过程中不可避免的存在一些非特异干扰，它时常导致纯度有所降低，并且有时导致目的蛋白活性一定程度的丢失。由于在亲和配基与结合蛋白质间相互作用的确切物理性质常常是不知道的，所以为了建立最有效的纯化规程需要反复试验和筛选。本章提出一些建议以促进蛋白质纯化亲和层析方法的发展。

12.2 亲和柱的制备

亲和柱的制备就是连接相关的亲和配体到不溶性介质的过程。对于大多数应用来讲，商业提供现成的亲和介质是方便实用和相对廉价的，建议实验者尽可能优先选用。而对于需要特殊的亲和介质的那些情况，本节将介绍制备亲和柱的具体步骤。

可以用多种试剂完成偶联亲和配体到介质上。通常采用两步程序，一是将一个反应基团结合到介质；二是在反应基团和配体之间形成共价键（图 12.1）。研究者必须决定选用的偶联策略，即选用何种反应基团和何种介质。

本节将重点叙述用溴化氰活化的琼脂糖凝胶配体固相化技术。绝大多数配体，如多肽、蛋白质、凝集素和核酸，都能较容易地用该法偶联。这一点后面还要讨论。其他偶联试剂在表 12.1 中列出。溴化氰方法被实验室广泛采用，大量文献报道了应用此技术的成功实例。

现将配体固相化的原理及要点简述如下：

偶联策略的选择：将配体偶联到介质的常用方法有两个：①配体和含有活化反应基团的介质混合。从而导致介质活化的反应基团与配体特异偶联基团（如氨基）之间形成共价键。预先在介质上活化反应基团，然后再和配体混合形成共价偶联，可以使配

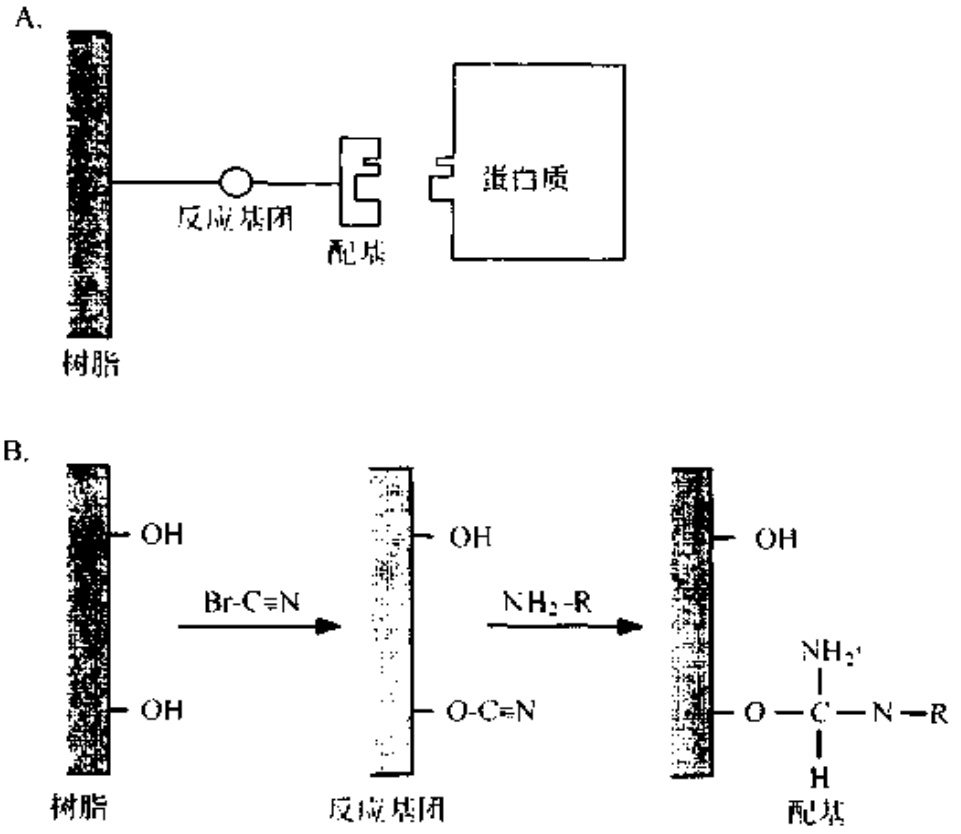


图 12.1　介质反应基团、配基和目的蛋白相互作用图解

体免于经历介质活化的严厉条件。②配体和一个双功能反应基团混合而活化，活化的配体再和介质混合形成共价偶联。此类方法较少使用，这里就不做进一步介绍。

偶联试剂的选择：将配体的不同部位固相化到各种介质可以选用多种试剂（表 12.1）。市场出售的已活化的介质并不昂贵，还可免于接触有毒的化学试剂。如果要偶联一个给定的配体又没有成熟的技术方法可循，那么最佳策略就是既简单又方便的从活化的介质开始。假如结合效率低或出现配体失活导致偶联失败，则应改选配体其他部位采用其他偶联试剂进行偶联。一些文献有较详细的介绍[12,23,24]。

介质的选择：如果配体是高分子量蛋白质，应当选择大孔径介质。这些大孔径介质必须是不易被压紧的，否则会导致难以接受的低流速。大多数情况，琼脂糖、交联琼脂糖、聚丙烯或聚丙

烯酰胺介质都是适用的。

表 12.1　亲和层析偶联试剂

配基结合基团	偶联试剂	适合的介质	供应商
氨基	溴化氰	琼脂糖	IBF, Pharmacia
		交联琼脂糖	
		聚丙烯	
		聚丙烯酰胺-琼脂糖	
氨基	戊二醛	聚丙烯酰胺-琼脂糖	IBF, Sepracor
氨基	羟基琥珀酰胺	交联琼脂糖	Bio-Rad, Pharmacia,
			Sigma
氨基或巯基	甲苯磺酰基或 tresyl 氯化物	琼脂糖	Pierce, Sigma,
		交联琼脂糖	Schleicher & Schuell
		聚丙烯	
羧基	1, 6-二氨基己烷	交联琼脂糖	Pharmacia
氨基或羧基	碳二亚胺	琼脂糖	Bio-Rad, Pharmacia,
		交联琼脂糖	Pierce
		聚丙烯	
		聚丙烯酰胺-琼脂糖	
碳水化合物	酰肼	交联琼脂糖	Bio-Rad, Pierce,
		聚苯乙烯	Sigma
		聚丙烯酰胺	

12.2.1　配基固相化技术

溴化氰活化的琼脂糖凝胶用于配体固相化是实验室最常用的固相化技术之一。其原理是溴化氰活化的介质与配体主要的氨基反应形成异脲键。但是这样偶联的亲和柱多次重复使用时，将会有少量配体脱落，所以反复使用的亲和柱应考虑选择其他活化的介质。异脲键的形成伴有荷电基团的增加，将会影响离子交换作用。为了克服这一影响需要在纯化时采用至少 0.1mol/L 的缓冲

盐液。该固相化方法简便廉价，并可广泛用于蛋白质、核酸和凝集素。

12.2.1.1 操作步骤

1）取 2g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶加入玻璃漏斗内1mmol/L盐酸中，用玻棒轻轻搅动 20 min 直至介质完全溶胀。静置待混悬的介质沉降后，用真空泵吸去液体。1g 干凝胶可以获得 3.5ml 溶胀胶；

2）用 200ml 1mmol/L 盐酸洗介质，共 3 次，每次洗后吸去液体；

3）用偶联缓冲液（0.1mol/L 碳酸氢钠，0.5mol/L 氯化钠，pH8.3）洗介质一次。因为活化基团在偶联缓冲液 pH 值下易水解，所以此步骤应尽可能快的进行，最好在几分钟内完成；

4）转移活化的琼脂糖凝胶至含 60～400nmol 配体的 30ml 偶联缓冲液的烧瓶里。如需测定结合效率一定要取少量配体溶液待测；

5）室温下轻轻混合、摇动或振动 2h，或 4℃过夜。不宜用磁力搅拌器处理，它能搅碎琼脂糖凝胶颗粒。如需测定结合效率此步骤结束时取少量溶液待测；

6）在烧结玻璃漏斗中用 200ml 偶联缓冲液洗偶联介质一次；

7）转移偶联介质至含 100ml 阻断缓冲液（1mol/L 乙醇胺，盐酸调 pH 至 8.0）的烧瓶内。室温孵育 2h 或 4℃过夜；

8）在烧结玻璃漏斗中依次用 100ml 偶联缓冲液 100ml 乙酸盐缓冲液（0.1mol/L 乙酸钠，0.5mol/L 氯化钠，pH4.0）洗偶联介质各一次；

9）重复四次步骤 8；

10）如偶联介质不准备立即使用，应用含 0.02% 叠氮钠的偶联缓冲液再洗一次；

11）配体固相化已完成，偶联好的介质可以装柱。

12.2.1.2 注　　意

1）估算结合效率。通过检测偶联前后所取的待测溶液中配体浓度，可以知道被固相化配体的量，从而计算出结合效率[23]。一般来讲，70%～80%的结合是最佳的；低结合将导致亲和柱的结合容量下降；过高的结合会产生空间障碍造成亲和柱结合能力减少。

2）许多因素都会影响偶联，造成很低的偶联效率。常见的主要有：过低的配体浓度、不适宜的 pH、配体不纯、介质处理不当、不适宜的偶联缓冲液及配体不易接近等。其中配体不易接近常由于存在空间障碍或配体过大造成。加入适量非离子去垢剂或促溶剂也许能获得改善。此外，类似 Tris 这样含有氨基的成分配制的缓冲液不宜使用，因为它们可能与介质偶联。

3）若配体在碱性 pH 下不稳定，偶联也可在较低 pH 的缓冲液内进行，但是效率会降低。

12.2.2　非特异洗脱的策略

亲和柱结合的目的蛋白洗脱的策略分为两类，即特异洗脱分离和非特异洗脱分离。使用饱和浓度竞争底物洗脱是特异洗脱，因为配体和底物的结合是特异性的，并且不造成亲和柱条件的改变。其不便之处是洗脱后的处理，亲和柱和洗脱的目的蛋白分别需彻底的清洗和透析以除去底物。亲和柱的特异洗脱不仅具有特异性而且温和、高效，所以是很理想的方法[26]。非特异洗脱分离是通过降低配体和目的蛋白亲和力达到洗脱目的的方法，下面将进行集中讨论。

影响配体和目的蛋白亲和力的因素较多，非特异洗脱常采用的主要有改变离子强度、改变 pH、促溶剂和蛋白质变性剂的使用等。当洗脱条件未确定时，首先要了解目的蛋白与配体之间相互作用的类型，如静电相互作用、疏水相互作用等，以选择适宜

的影响亲和力的条件洗脱分离；其次进行比较试验，以确定最佳洗脱方案。试验时将配体包被到 96 孔酶联板上，加入目的蛋白溶液，然后在不同的孔内用不同的洗脱液洗脱[6]。通常先试验温和的洗脱条件，效果不好再试较严厉的洗脱条件。应尽可能采用温和高效的方法，尤其是目的蛋白不太稳定的情况下。表 12.2 列出常用的洗脱条件供选择参考，排列顺序基本是从温和到严厉。

表 12.2　亲和层析的非特异洗脱条件

破坏静电相互作用	增加离子强度
破坏疏水相互作用	减少离子强度
	非离子去垢剂
	极性减少剂
温度作用	通常减少温度
低 pH	0.1mol/L，pH2.5 甘氨酸缓冲液
	1mol/L 丙酸
高 pH	0.15mol/L，pH10.5 氢氧化氨
	0.1mol/L，pH10.7 Na-CAPS
	0.05mol/L，pH11.5 三乙醇胺
促溶剂	4mol/L 氯化镁（在 10mmol/L，pH7.0 PBS 中）
	2.5mol/L 碘化钠
	3mol/L NaSCN *
蛋白质变性剂	8mol/L，pH7.0 尿素 *
（列出浓度为上限，低浓度可能也有效）	6mol/L 盐酸胍乙腙 *
	50%，pH11.5 ethanedial
	10% 二恶烷（在乙酸中）
	50%，pH8～11.5 乙二醇
	1% SDS *
	1% 脱氧胆酸盐 *

* 此类处理可使大多数蛋白质发生变性。

讨论：

1）为减少污染物与亲和柱的结合，使用高或低离子强度溶液洗柱。从而分别减少非特异离子结合或疏水结合。用低浓度洗脱溶液洗柱也是常用的方法之一。

2）与离子交换层析一样，梯度洗脱也会产生尖锐的洗脱峰。

3）分离纯化使用的亲和柱亲和容量过大可能使洗脱峰变宽。

4）在任何层析缓冲液中如含有二硫苏糖醇或β-巯基乙醇都会导致蛋白质二硫键的破坏，造成目的蛋白变性或蛋白复合物的解离。

5）有的情况下，同时在较低浓度用两种不同性质的洗脱液洗脱可以更有效的破坏配体和目的蛋白的相互作用，获得较高的洗脱效率和产物回收率。

6）通常非特异洗脱的产物回收率为40%～70%。

12.3 特异分离技术

12.3.1 抗　　体

12.3.1.1 抗体的纯化

抗体在亲和层析试剂中所占地位日趋重要，所以纯化抗体的方法也倍受关注，其中最常用的方法有必要加以介绍。抗体通常是从血清、杂交瘤上清或腹水中获得的。尽管直接使用上述未纯化的抗体溶液可进行一些免疫学实验，但是要获得满意的结果最好使用纯化的抗体，特别是用于亲和层析的抗体。实际上，纯化的抗体也适用于免疫检测、免疫印迹、酶联试验（ELISA）或细胞染色等[12]。

虽然传统的蛋白质纯化方法，如沉淀或层析技术可用于纯化抗体，但是利用细菌胞壁蛋白的特性可以提供了一个快速、简捷、特异、高效的抗体纯化方法。这里细菌胞壁蛋白主要指蛋白A和蛋白G，它们分别从金黄色化脓性葡萄球菌和G组链球菌分离纯化。它们能特异结合到免疫球蛋白的Fc部分（见图12.2）。由于它们对不同的免疫球蛋白有不同的亲和力（表12.3），所以应根据免疫球蛋白的种类和类型选择蛋白A或蛋白G。例如，纯化免疫兔产生的多克隆抗体需选用蛋白A分离纯化，而免疫羊产生的多克隆抗体则用蛋白G。不同种类及类型的免疫球蛋白与二者亲和力的比较在表12.3中列出。同理，具有蛋白A或蛋

白G结合部位的嵌合蛋白也可用于抗体的分离纯化。蛋白A或蛋白G与抗体的结合可以通过酸碱度、盐浓度和温度的改变解离。蛋白A或蛋白G在实验室就能有效地偶联到介质上（见12.2）。商业提供的偶联了蛋白A或蛋白G的介质更加方便合用。天然的蛋白A或蛋白G也具有白蛋白结合部位，使用时会导致白蛋白的污染，但是供应商提供的已除去白蛋白结合部位的工程产品避免了上述缺陷。蛋白A或蛋白G层析柱操作的方案和步骤将在后面介绍。

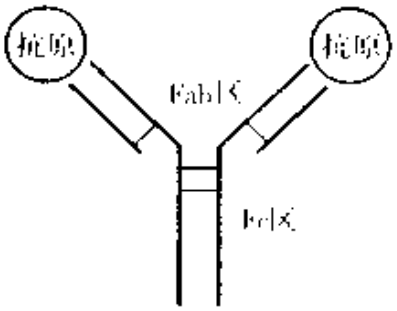


图 12.2　　抗体结构

传统的抗体纯化方法有沉淀法和层析法，前者包括硫酸铵和辛酸沉淀法等，后者包括离子交换和凝胶过滤法等。这些方法所用步骤较多，如硫酸铵沉淀后通常还需经DEAE离子交换层析纯化。故传统方法一般在亲和纯化法无效或无条件时采用，例如纯化IgM时[7]。除了优先选择蛋白A或蛋白G层析柱亲和纯化外，另一优先选择是使用抗抗体免疫亲和柱。它由抗目的抗体Fc片段的特异抗体构成。Page[21]和Coligan[7]等介绍了具体细节。其纯化效果与蛋白A或蛋白G方法一样好。在纯化过程中检测抗体的结合活性是重要的，以便确定目的抗体是否仍保留其活性。

表 12.3　不同种属免疫球蛋白与蛋白 A 或 G 的结合强度

	蛋白 A	蛋白 G
人		
IgG1	强	强
IgG2	强	强
IgG3	不结合	强
IgG4	强	强
IgM	较弱	不结合
小鼠		
IgG1	弱	强
IgG2a	强	强
IgG2b	强	强
IgG3	强	强
IgM	弱	弱
大鼠		
IgG1	弱	弱
IgG2a	不结合	强
IgG2b	不结合	强
IgG2c	强	强
鸡	不结合	不结合
兔	强	强
山羊		
IgG1	弱	强
IgG2	强	强
绵羊		
IgG1	很弱	强
IgG2	强	强

表 12.4　典型的抗体溶液浓度*

来　源	抗体类型	抗体浓度（mg/ml）
血清	多克隆	10
组织培养上清	单克隆	0.0005～0.05
无血清培养液		
腹水	单克隆	1～10

*引自文献［12］。

（1）操作步骤

与蛋白 A 或 G 结合的抗体最常用低 pH 溶液洗脱。应该注意在酸性条件下抗体不太稳定，较好的办法是用缓冲能力强的中性溶液收集洗脱组分。使目的抗体洗脱后很快进入中性环境，以免失活。其他洗脱缓冲液将在后面介绍。典型来源的抗体浓度在表 12.4 中列出，仅供参考。

蛋白 A-或 G-Sepharose（琼脂糖）柱的制备

1）建议从商业提供的蛋白 A-或 G-琼脂糖开始。如从蛋白 A 或 G 偶联到介质开始，则偶联到溴化氰活化的琼脂糖的方法前面 2 已做介绍；

2）蛋白 A-或 G-琼脂糖在起始缓冲液（100mmol/L，pH7.5 Tris-HCl，100mmol/L NaCl）内室温放置 30min。每 g 介质约用 10ml 缓冲液。水合作用期间干介质体积将溶胀 3～4 倍。此后步骤如不注明均在室温下进行；

3）溶胀后的介质在起始缓冲液内装柱。再用 5～10 倍体积同样缓冲液洗柱，建议最大流速为 1ml/min；

4）3～5 倍体积 0.1mol/L，pH2.5 glycine-HCl 洗柱。洗去可能存在的污染物；

5）再用 5～10 倍体积起始缓冲液平衡柱。若欲存放则应用含 0.02% NaN_3 的起始缓冲液平衡，然后 4℃保存；

制备抗体溶液

6）抗体样品液离心 10 000×g，10min，除去沉淀；

7） 用等体积起始缓冲液稀释样品，或加入 1/10 体积 10× 起始缓冲液，以获得适当的 pH 和离子强度；

上样

8） 上样，即将缓冲好的样品液加到亲和柱内。每 ml 溶胀介质可以上样 2ml 多克隆抗体血清或 20ml 单克隆抗体上清。通常上样的总 IgG 量应略低于柱总结合容量的 80%，每 ml 溶胀介质能结合 5～20mg IgG；

9） 在洗脱前，用 10 倍体积起始缓冲液洗柱。让 A_{280} 值恢复到基线或本底水平；

样品洗脱

10） 用 5～10 倍体积 0.1mol/L glycine-HCl（pH2.5）缓冲液洗脱结合的抗体。洗脱液以 1ml 为洗脱组分分部收集，收集试管含 0.1ml 1mol/L Tris-HCl（pH8.0）缓冲液以便及时中和低 pH；

11） 汇集 A_{280} 大于等于 0.2 的峰组分；

12） 若需除去盐分或改变缓冲液，可以在磷酸缓冲盐液（137mmol/L NaCl，2.7mmol/L KCl，6.5mmol/L Na_2HPO_4）中透析，或过凝胶离心柱（详见第十章），或用超滤的方法（详见第四章）；

13） 以 1ml 为单位分装，近期用的存放 4℃，长期储存放 −20℃；

14） 亲和柱用 5 倍体积 0.1mol/L glycine-HCl（pH2.5）洗脱液再次洗后，用 10 倍体积起始缓冲液平衡，即可再次使用。如欲存放，用含 0.02% NaN_3 的起始缓冲液平衡后 4℃保存。

（2）讨论

1） 蛋白 A 或 G 亲和柱如能像上面叙述的方法保存，至少可以使用十次以上而没有任何结合活性的丢失。

2） 抗体滴度常用以表示抗体溶液的相对结合活性。根据选用的检测方法如免疫印迹或免疫酶联试验（ELISA），

测得半量最大信号时抗体的稀释度即是该抗体滴度。抗体纯化后应测定其滴度作为抗体功能的评定，通常做抗体溶液的系列等倍稀释检测。

3) 抗体储存应给予重视。抗体应尽可能在中性以浓溶液（至少 1mg/ml）形式储存。长期储存应置于 -20℃或更低温度。一般抗体在此条件下可稳定存放数年，甚至含盐量达 150mmol/L 也不丧失活性。反复冻融将使一些抗体失活。4℃较长时间储存也会减少抗体活性。有关信息可查阅 Harlow 等的文章[12]。

4) 抗体溶液定量。作为粗略的方法是 1mg/ml IgG 的 A_{280} 值约为 1.4。也可以用标准的蛋白质定量测定法（见第三章）或 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法（见第五章）。在非还原型 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（即不用 β-ME）时会观察到分子量为 150kDa 的带，而含 β-ME 的还原型电泳将显示 25kDa 的轻链和 50kDa 的重链带。

5) 虽然多数情况用酸性洗脱液从蛋白 A 或 G 亲和柱上洗脱抗体，但是应看到低 pH 确实使一些抗体变性。所以纯化前后都应检测抗体溶液的结合活性。Coligan[7] 推荐小鼠抗体用 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液洗脱，pH6.5 用于 IgG1 洗脱；pH4.5 用于 IgG2a；pH3.0 用于 IgG2b 或 IgG3。

6) 纯化抗体的结合活性可用酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫印迹或免疫沉淀进行检测[7,12]。

7) 多克隆抗体能用抗原亲和柱进行相对特异的纯化。例如，用一个多肽免疫产生的多克隆抗体可经该肽固相化制备的亲和柱纯化。

8) 制备单克隆或多克隆抗体的方法和抗体标记技术可查阅有关文献 [2，7，11，12，33]。

12.3.1.2 免疫纯化

在蛋白质纯化方法中抗体亲和纯化是非常有效的方法之一。仅此一步常可获得 1000～10000 倍的纯化。如果抗体与目的蛋白的结合的特异性得到证明，并且洗脱的目的蛋白没有受到不可逆的损伤，那么可以认为免疫纯化是极好的蛋白质纯化方法，特别是用在纯化过程的最后步骤。

制备免疫亲和柱要求抗体首先共价结合到介质上。另一方法是将抗体结合到蛋白 A 或 G 小珠上，再用交联剂固相化[12]。后一方法由于蛋白 A 或 G 结合在抗体的 Fc 区（见图 11.2），所以结合抗原的部位获得充分暴露，从而易于接近。免疫亲和柱制备完成后，抗原溶液即可以上样，接着洗去污染物，然后洗脱抗原。如果不能利用特异的配基破坏抗原抗体之间的相互作用来洗脱，只好采用非特异洗脱方法。前文已做过介绍不再赘述。但是非特异洗脱方法一定要小心应用，以免目的蛋白失活。有关内容也可以参看文献［12，14，18，24］。

单克隆抗体通常在免疫亲和纯化中比多克隆抗体更有用。单抗代表与目的蛋白具有单一特异结合部位的均一抗体，因而它的结合是确定一致的。洗脱也如此，因为只需破坏单一类型的相互作用就能释放目的蛋白。应当说，多克隆抗体在亲和纯化中也是可用的，特别是用很纯的抗原免疫动物产生的多克隆抗体。总之，进行有效的免疫纯化的主要关键是获得特异抗体，它与底物之间具有 YI 一定强度的亲和结合力。该强度的结合力一方面可以在洗柱过程中保持底物蛋白仍然结合在柱上，不被洗脱；另一方面又不至于结合太紧难以洗脱，采用极端洗脱条件而造成底物蛋白变性。所以选择用于免疫纯化的抗体的方法应是试验一组单克隆抗体，挑选不仅具有足够的亲和结合力，而且还能洗脱下完整抗原的抗体。

免疫纯化的质量取决于抗体溶液的纯度。制备免疫亲和柱使用的抗体既要具有前面提到的特性，又要尽可能的纯。免疫亲和

柱的制备是相当昂贵的，其结合容量却相对较低，常常每 ml 介质结合不到 1mg 抗原。因此为了节省和提高效率，经常制备的是小而粗的柱子，同时在亲和纯化步骤里要求样品溶液重复几次上样，以便纯化更多的抗原蛋白。此外，较小的柱子也可以减少和限制柱污染或蛋白酶灭活造成的抗体丢失。

免疫沉淀也可看作另一类型的免疫亲和纯化。还有一个类型是反向免疫纯化，它利用抗体柱除去溶液中特异的污染物—抗原。

（1）操作步骤

抗体亲和柱装好后，以下几个问题需要注意。配基在使用的缓冲液 pH 条件中应是稳定的。不要让柱内溶液流干。所有溶液都应经过 0.22μm 滤膜过滤除菌，以获得最大柱寿命。介质的抗原结合容量测定，可在试管内进行。该试验是在一组试管中加入恒定量的抗体介质及递增量的抗原，混合后测定。需要说明的是下面的步骤中假定抗原在低 pH 条件下是稳定的，则采用低 pH 洗脱。

抗体亲和柱的平衡

1）5～10 倍柱体积的起始缓冲液，如磷酸缓冲盐液（PBS）洗柱；

2）3～5 倍柱体积的洗脱缓冲液，如 0.1mol/L，pH2.5 glycine-HCl，洗去污染物；

3）5～10 倍柱体积的起始缓冲液平衡柱；

上样

4）通过透析、凝胶过滤、加 1/10 体积 10×起始缓冲液至样品液等方法用起始缓冲液平衡样品。样品需事先 100 000×g，离心 30min 或经 0.22μm 滤膜过滤处理；

5）上样到柱子。上样时较慢的流速可以获得更好的抗原结合。样品应循环重复上样几次；

洗柱

6）5～10 倍体积起始缓冲液洗柱，或用该液洗至 A_{280}值达

到基线或本底水平。若抗原抗体相互作用较强，起始缓冲液内可含一定浓度的盐，如 0.5mol/L KCl 以减少非特异结合；

蛋白质洗脱

7) 2 倍体积洗脱缓冲液，如 0.1mol/L，pH2.5 glycine-HCl，洗柱。以 1ml 为单位分部收集洗脱液。每个收集试管预先加入 0.1ml，1mol/L，pH8.0 Tris-HCl，立即中和洗脱液的低 pH；

8) 检测各组分，合并活性组分；

9) 如果抗原的稳定性有限需要立即更换缓冲液，则通过透析或凝胶过滤完成；

亲和柱的再生

10) 10 倍体积 0.2mol/L，pH2.5 glycine-HCl，洗柱，然后用 10～20 倍体积 PBS 洗柱，要储存时用含 0.02% NaN_3 的 PBS 洗柱。

(2) 讨论

1) 尽管使用高亲和结合力抗体是令人向往的，尤其是从稀溶液中纯化抗原时，但是过强的结合力不利于洗脱。中等强度的亲和结合力（10^{-7}mol/L）常常是最理想的[14,22]。

2) 免疫亲和柱即使是最轻的微生物污染也能导致抗体的水解，所以使用无菌的缓冲液和样品溶液是必要的，柱子的储存条件也要严格执行。

3) 免疫亲和纯化常常在室温进行。

4) 为减少非特异的本底，样品液可预先通过一个未偶联抗体的介质柱。

12.3.2 核　　酸

核酸亲和柱的应用极大地促进了核酸结合调节蛋白特性的研究，这些蛋白质涉及基因表达、染色体修复和复制、基因重组等

的调控。核酸结合蛋白可以结合单链 DNA、双链 DNA 或 RNA。DNA 结合蛋白结合 DNA 可以是序列特异的，也可以是非特异的。此外，含有特异寡核苷酸的亲和树脂能用于某些酶的分离，这些酶利用结构非常相似的辅酶，如 NAD 和 NADP。总之，核酸亲和柱在各种蛋白质的纯化和特性研究中是一个有用的工具。

本文的讨论将集中于寡脱氧核苷酸亲和介质在蛋白质纯化中的应用，主要强调核酸亲和层析分离的技术问题。这里提供的信息很容易扩展到其他方法，例如用偶联到瓷珠上的生物素化的 DNA 进行的蛋白质纯化。

在进行寡核苷酸亲和纯化前，一些基本的要求必须明确。最重要的是确定最小的核酸结合序列。Kadonaga[16]观察到：成功的亲和纯化使用的寡核苷酸长度在 14～51 个碱基之间。其次，隔开介质和识别序列的隔断（或称作臂）的长度会影响识别序列和蛋白质的接近。较长时二者易于接近发生相互作用，反之则难于接近。若选用一个较长的寡核苷酸识别序列时可以省去隔断。最后，固相化所用的介质应该具有适宜的液体流动特性从而允许蛋白质或蛋白质复合物接近核酸序列。大多数应用选择 Sepharose 4B 作为介质。在下面的操作步骤里将介绍用溴化氰活化的 Sepharose 4B 进行配基固相化。

在核酸亲和层析中需要考虑的重要问题是非特异结合。因为亲和配基通常仅由四种碱基构成，所以也经常发生非特异蛋白质与配基结合。针对此问题，推荐三种基本解决方法。第一个方法是利用一个非特异寡核苷酸亲和预装柱。此柱可以用未偶联的介质，如 Sepharose 4B 制备，也可用含随机的或杂乱无序的核酸序列亲和柱。第二个方法是纯化时亲和柱内有过量的可溶性非特异寡核苷酸，它防止非特异核酸结合蛋白结合到柱上。第三个方法用于已知非特异蛋白与高亲和结合部位侧翼序列相结合的情况。重新构建一个亲和柱，改变其高亲和结合部位的侧翼序列。采用上述三种方法通常遇到的非特异蛋白结合问题基本都能获得解决。

12.3.2.1 操作步骤

(1) 偶联寡核苷酸到溴化氰活化的 Sepharose 4B

DNA 偶联至溴化氰活化的 Sepharose 4B 是通过它们本身的碱基实现的。从理论上讲，该方法也许干扰最佳结合序列的接近路径，但是这样一个简单的方法一直被广泛地成功应用。如何制备和纯化寡核苷酸请查阅相关文献 [13，16]。偶联效率的定量检测可经 A_{260}值测定评估，或者更精确地从偶联介质上水解核酸和进行磷酸盐测定[4]。

1) 混悬 1.5g CNBr-Sepharose 4B 在水中，室温静置 30min 约可获得 5ml 溶胀的胶。经烧结玻璃漏斗过滤，当水分滤尽而溶胀的胶仍是潮湿的时候，立即停止抽滤；

2) 胶在漏斗内，依次用 4℃，200ml 1mmol/L HCl、200ml 水和 200ml 10mmol/L，pH8.0 磷酸钾缓冲液清洗；

3) 将胶移入含 2ml 10mmol/L，pH8.0 磷酸钾缓冲液的 15ml 试管内；

4) 加 50μl 寡核苷酸到试管，约每 ml 胶需用 2nmol 寡核苷酸。室温下振摇 16h；

5) 再移入烧结玻璃漏斗，抽滤除去液体；

6) 先后用 200ml 水和 100ml 1mol/L，pH8.0 乙醇胺-盐酸清洗；

7) 将胶移入聚丙烯试管，在 7ml 1mol/L，pH8.0 乙醇胺-盐酸中混悬。室温下摇 4～6h。该步骤灭活未偶联的活化的胶；

8) 在烧结漏斗中，依次用下述溶液洗胶。100ml 10mmol/L，pH8.0 磷酸钾缓冲液；100ml 1mol/L，pH8.0 磷酸钾缓冲液；100ml 1mol/L KCl；100ml H_2O；100ml 储存缓冲液（10mmol/L，pH7.6 Tris-HCl，0.3mol/L NaCl，1mmol/L EDTA，0.02%

NaN_3）；

9） 4℃可储存一年。

（2）核酸亲和层析

在上样品液到核酸亲和柱之前，建议首先采用其他的纯化方法，如硫酸铵沉淀、离子交换或凝胶过滤层析等富集目的蛋白。这样可以除去绝大多数的污染物，并减少非特异结合。亲和层析柱一般来讲是短而粗的，例如长宽比为 2:1。

1） 10 倍柱体积的平衡缓冲液（如 20mmol/L，pH8.0 Tris-HCl，0.15mol/L KCl，1mmol/L EDTA）平衡柱；

2） 调整样品液到相似的离子浓度（即 0.15mol/L KCl）；

3） 加非特异 DNA 到样品液内，每 μg 蛋白质加 100ng。混匀后在冰上孵育 10min。非特异 DNA 长度通常是 1kb 左右，可以是 poly（dI-dC）或 poly（dA-dT），也可以是超声破碎的大肠杆菌、牛胸腺或鲑鱼精 DNA。为了除去孵育后可能形成的复合物，需 10 000 × g 离心 10min，弃去沉淀；

4） 缓慢地将样品液上样到亲和柱，流速 15ml/h；

5） 5 倍体积平衡缓冲液洗柱；

6） 分别用 1 倍体积各含 0.2、0.3、0.6 和 1.0mol/L KCl 的平衡缓冲液洗脱目的蛋白；

7） 检测各收集组分的活性，并汇集有特异活性的组分。因为蛋白质浓度时常较低，故常加入非离子型去垢剂 Triton X-100（终浓度 0.05%）以减少容器壁对蛋白质的吸附。需要注意的是该去垢剂会干扰 A_{280}测定；

8） 在 -70℃储存活性目的蛋白组分；

9） 用 10 倍体积的含 2.5mol/L NaCl 和 0.5mol/L EDTA 的平衡缓冲液洗柱使亲和柱再生。然后用含 0.02% NaN_3 的平衡缓冲液再平衡后将柱 4℃储存。

12.3.2.2 讨　论

1）用结合序列核酸特异地洗脱核酸结合蛋白是很有效的方法。层析柱的洗脱需采用高浓度的寡核苷酸。

2）常见的DNA结合蛋白检测方法有滤膜结合[5]、凝胶阻滞[8]和DNAse足迹法[9]。注意确定层析时非特异竞争结合的DNA量需用活性检测方法。

3）通过除去可溶性特异序列DNA的方法从目的蛋白溶液中除去DNA也许会增加产量。DNA可以用DNAse消化或用1%聚乙烯亚胺或硫酸链霉素（可达5%浓度）沉淀去除。在处理去除可溶性寡核苷酸后，缓冲液应加入EDTA以除去二价离子和灭活DNAse。

4）通过偶联前后测定溶液的A_{260}值能估算偶联到介质的DNA量。

5）影响DNA与蛋白质结合和洗脱的一些因素包括温度、pH和镁浓度。

6）DNA与蛋白质结合可能需要某些辅助因子，如ATP、Mg、S-腺苷甲硫氨酸（SAM）等。因此，除去它们也许有助于洗脱[1]。

7）溴化氰活化的介质会慢慢地发生寡核苷酸置换，在5～10次层析纯化后柱子应废弃。

8）因为绝大多数结合蛋白都是碱性蛋白，所以在亲和纯化前通常先用离子交换层析除去酸性蛋白。此外，核酸结合蛋白也能用一些非特异层析方法进一步纯化，如肝素、磷酸纤维素和凝集素。

9）最初的有关亲和层析的文献源自Kadinaga[16]。此外，Jarrett[15]写了一篇极有用的核酸亲和层析技术的综述。

12.3.3 凝　集　素

凝集素是能可逆性结合碳水化合物的蛋白质。因为绝大多数

凝集素至少每个分子有两个碳水化合物结合部位，所以它们可以沉淀糖蛋白和凝集细胞。凝集素也就可以用作糖蛋白的亲和配基，具有单糖的糖蛋白可用温和的蛋白质洗脱条件分离。虽然凝集素亲和层析没有很高的选择性，但是无疑它已成为蛋白质纯化的一种常用方法。它通常作为系列纯化步骤之一。凝集素亲和柱也可用于除去作为污染物的糖蛋白。表 12.5 列出一些常用的凝集素，其中许多可以从市场获得偶联到介质的商品。

表 12.5　　凝集素

凝集素	特异性	洗脱糖类	保护性糖类	需要离子
刀豆素 A	α-D-甘露糖	α-D-甘露糖	甲基 α-D-甘露糖苷	Ca^{2+}, Mn^{2+}
	α-D-葡萄糖	α-D-葡萄糖		
		甲基 α-D-甘露糖苷		
扁豆凝集素	α-D-甘露糖	α-D-甘露糖	甲基 α-D-甘露糖苷	Ca^{2+}, Mn^{2+}
	α-D-葡萄糖	α-D-葡萄糖		
		甲基 α-D-甘露糖苷		
麦芽凝集素	N-乙酰葡糖胺	N-乙酰葡糖胺	N-乙酰葡糖胺	Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}
		唾液酸		
波罗蜜蛋白	α-D-半乳糖	D-半乳糖	D-半乳糖	无
		蜜二糖		
蓖麻毒素	α-D-半乳吡喃糖	N-乙酰半乳糖胺	甲基-β-半乳糖苷	无
		乳糖		
		D-半乳糖		

用于亲和层析的凝集素应根据它们结合的特异性和紧密度加以选择。例如，刀豆素 A（Con A）与糖蛋白含有的葡萄糖或甘露糖结合，而麦芽凝集素只与具有 N-乙酰葡糖胺的蛋白质结合。更多的细节建议查阅文献[19]。胞膜糖蛋白常与麦芽凝集素结合，而可溶性糖蛋白却通常用 Con A 或扁豆凝集素亲和柱纯化。寡糖结构和凝集素结合的重要作用可参阅 Sutton[30]的讨论。由于

在许多情况下被纯化的糖蛋白的结构和特性不清楚，所以筛选一些凝集素与目的蛋白的结合状况常常是有用和必要的。用于此目的的凝集素试剂盒也可购得。

一些仅适用于凝集素亲和层析的重要事项应牢记。正如表12.5列出的那样，一些凝集素在它们的结构整合中需要某些二价离子。因为凝集素亲和层析常常涉及膜蛋白质，故经常需要去垢剂以保持这些蛋白质的可溶性。虽然凝集素对非离子型去垢剂相当宽容，但是离子型去垢剂减少它们的特异结合。

12.3.3.1 操作步骤

凝集素亲和层析相对易于操作。可用许多方法将凝集素固相化到介质。溴化氰偶联是普遍采用的方法，具体步骤可参阅前面的介绍。每 ml 介质材料能偶联 1～10mg 凝集素。偶联时含有适宜的二价离子（0.1mmol/L）和保护性糖类（5%，w/v）（见表12.5）是关键。保护性糖类在偶联过程中使结合部位不易接近而受到保护。许多凝集素亲和柱也可从市场购得。

以下步骤以介绍刀豆素 A 亲和柱纯化蛋白质为例，其他凝集素亲和柱的纯化步骤基本相似，只要换成适宜的洗脱用糖。相对长而细的层析柱有更好的分辨率，短而粗的柱子在小体积洗脱时具有更快的流速。小的试验柱（例如装填在巴斯德吸管内的）或在小离心管内进行的层析试验可用于估算柱的结合容量。

1） 制备刀豆素 A 亲和柱的基本方法，参阅前面已有的详细介绍；

2） 用 10 倍柱体积的层析缓冲液（20mmol/L，pH8.0 Tris-HCl，0.15mol/L NaCl，1mmol/L $MnCl_2$，1mmol/L $CaCl_2$，30mmol/L 辛糖苷）平衡装好的亲和柱；

3） 糖蛋白样品液对层析缓冲液透析或用该缓冲液 1∶1 稀释，然后离心或过滤除去沉淀；

4） 将调整好的糖蛋白样品液上样到亲和柱；

5） 用层析缓冲液洗柱至 A_{280}值回到基线；

6） 用5倍柱体积含10mmol/L甲基-α-D-甘露糖的层析缓冲液洗脱；

7） 继续分别用5倍柱体积含20、50、100、250和500mmol/L甲基-α-D-甘露糖的层析缓冲液洗脱；

8） 检测目的蛋白组分。汇集的目的蛋白组分透析除去糖；

9） 用含1mol/L NaCl的层析缓冲液洗柱，以获得再生；

10） 欲储存时，用含0.02% NaN_3 的层析缓冲液洗柱，防止污染。

12.3.3.2 讨　论

1） 为改进凝集素-糖蛋白的结合，降低上样时流速。或通过一批试验，筛选出最大凝集素-糖蛋白相互作用的条件。此外，增加柱温到37℃可以改进糖蛋白的结合。

2） 洗脱步骤前用高盐溶液洗柱能减少非特异结合。

3） 以下几个方法可试用改进糖蛋白的洗脱。

- 用洗脱液开始洗脱后关闭柱子，停止洗脱液流动，从而增加蛋白质-凝集素解离作用的时间。放置过夜可能会获得更好的目的蛋白回收率。
- 有时温热亲和柱促进蛋白质的结合，适当降温常常有相反的作用，即促进洗脱。
- 硼酸盐缓冲液（0.1mol/L，pH6.5）有助于困难的洗脱，因为硼酸盐能与某些糖络合

4） 溴化氰活化的介质可以含有带电基团，它们能导致一个离子交换作用。该干扰可经含0.1mol/L盐的层析缓冲液洗柱最大限度地清除。

5） 一些成功用于凝集素亲和层析的去垢剂包括Triton X-100、Nonidet P-40和Octyl β-D-glucoside。需要注意的是前两者在280nm有较强的光吸收。

6） 如果纯化膜蛋白，凝集素应通过亲水而不是疏水空间臂偶联到介质。这样可以减少非特异疏水相互作用。在这

种情况下，乙二醇（浓度可达 50%）有助于减少疏水作用。有关的膜蛋白纯化，Thomas & McNamee[31] 曾作过综述。

7） 分步洗脱比梯度洗脱通常更成功。

8） 容易与二价离子产生沉淀的磷酸盐缓冲液应避免使用。

9） 检测糖蛋白的一些方法可参阅 Gerard 的介绍[10]。

10） 除溴化氰活化的琼脂糖外，其他活化的介质，如 AffiGel 10、AffiGel 15 或 carbonyldiimidazole（CDI）琼脂也可选用[32]。

12.3.4 染料配基

染料配基层析不是真正意义的亲和层析，因为它们并不是与它们结合的蛋白质的天然配基。然而染料柱能很好地结合蛋白质，并能导致满意地纯化蛋白质。事实上，有时这种结合甚至比正常的配基更紧。染料配基柱通常是廉价和稳定的，并且具有较高的蛋白质结合容量。所以染料配基层析能作为蛋白质纯化中有价值的步骤之一。

选择纯化特异蛋白质的适宜染料一般是通过反复试验比较后决定。Cibacron Blue F3GA，作为该领域的先驱染料与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸很相似，并且一直用于纯化激酶、水解酶、聚合酶和其他核苷酸依赖的蛋白质。但是这种结合特异性不是绝对的，Cibacron Blue 也用于不具有核苷酸结合功能的各种蛋白质的纯化。蛋白质与染料的结合可能涉及疏水、静电或氢键结合力等。因此，尽管有市售的筛选各种染料的试剂盒，选择纯化给定蛋白质的最佳染料也没有现成的方法可循。Scopes[27] 按照与蛋白质结合的能力将染料分类，并推荐了一个选择最有效染料的系统。

染料配基层析的操作比较简单。基于一些支持介质的染料层析柱填料可从市场获得（见表 11.6），这些推荐的商品都有很好的可再生性。在选择适宜的染料配基时，非常实用的方法是连续进行几种染料配基层析试验，如果第一种不结合目的蛋白，也许

第二种就会结合。洗脱时，绝大多数蛋白质是采用高盐方式洗脱，虽然后面还提及其他方法。染料配基柱若是与目的蛋白结合能力很有限，则可以降低溶液的 pH 值或应用二价、三价阳离子时常会得到改善。总之，遵循上述这样几个办法，染料配基层析将在蛋白质纯化中发挥重要作用。

表 12.6　染料配基层析中常用的染料

Cibacron Blue F3GA
Procion Blue H-B
Procion Blue HE 3B
Procion Yellow H-A
Procion Green H-E4BD

12.3.4.1　操作步骤

在开始染料配基层析纯化蛋白质之前，必须确定所用的染料。如前所述，需用不同染料柱进行小规模（1ml 柱）试验筛选。Scopes[27]推荐的策略可供参考。此外，进一步的小规模试验可用于优化洗脱参数。有必要提醒注意的是：一个能与许多蛋白质结合而不结合目的蛋白的染料配基柱非常有用。它可以作为最终纯化前去除杂蛋白的极佳步骤。以下介绍 Cibacron Blue F3GA 柱用高盐溶液洗脱的方案。

1）用 5ml Cibacron Blue F3GA-琼脂糖装填一个层析柱。对大多数实际应用来讲，短而粗的柱子应能获得满意效果。长而细的柱子多用于纯化结合力弱的蛋白质，虽然流速会有所下降；

2）10 倍柱床体积的层析缓冲液（例如，20mmol/L，pH8.0 Tris-HCl，0.1mol/L NaCl）平衡装好的柱子；

3）为了达到上样要求，蛋白质样品液需转换成近似层析缓冲液的条件，即通过用层析缓冲液透析或 1:1 稀释来进行。上样前样品液应经离心或过滤达到澄清。5ml 柱子

能上样 50～200mg 蛋白质样品。除非蛋白质结合容量非常高，通常上样蛋白质浓度应在 10～20mg/ml 范围；

4） 上样到层析柱；

5） 5 倍柱床体积层析缓冲液洗柱或洗至 A_{280}值回到基线；

6） 5 倍柱床体积洗脱缓冲液（例如，20mmol/L，pH8.0 Tris-HCl，1.0mol/L NaCl）洗脱目的蛋白；

7） 检测洗脱组分中的目的蛋白，并汇集含活性目的蛋白的组分；

8） 再生层析柱。先用 3 倍柱床体积 1mol/L NaOH 洗柱，再用 10 倍体积含 0.02% NaN_3 的层析缓冲液洗柱即可。

12.3.4.2 其他洗脱策略

1） 如果染料占据的是配基结合部位，那么可以用配基（如 NAD 或 NADP，浓度范围 1μmol/L 至 25mmol/L）进行更特异的洗脱。

2） 用 EDTA 除去金属离子有时有助于洗脱。

3） 增加 pH 值可能比盐溶液洗脱更有效。因为更碱性的溶液有减少蛋白质与染料配基柱结合的趋势。

4） 当蛋白质结合以疏水相互作用为主时，减少溶液的极性（用 20% 乙醇、10% 异丙醇或 10%～50% 乙二醇）也促进目的蛋白的洗脱，但是洗脱峰有增宽的趋势。

5） 促溶离子（如脲、LiBrhuo 或 KSCN）也能用于洗脱，但它们时常引起蛋白质变性。

利用磷酸盐缓冲液能减少非特异相互作用，尽管它能导致多价阳离子沉淀。

12.3.4.3 讨　论

1） 影响洗脱的最有用的变量是 pH、离子强度和温度。更高的 pH 或离子强度均倾向于减少蛋白质的结合。

2） 更严厉的再生条件包括 6～8mol/L 脲、盐酸胍乙腚或

2～4mol/L硫氰化钠。

3) 现在有各种用于染料配基层析的介质，如 Sepharose、Ultrogel、Trisacryl 和 Bio-Gel A，它们有极好的刚性和流速。

4) 必须在系列实验中小心地使用同样的染料配基柱，即使有很多渠道和不同的供应商提供相似的染料。因为，不同来源的一种染料，甚至同一来源不同批次的染料都可能具有层析特性上的差异。而且不同制造商的染料配基介质很可能固相化了不同量的染料。

5) Lowe & Pearson[20]，Angal[3]和 Scopes[27]都介绍了染料固相化到介质的方法。

12.3.5 固相化金属亲和层析

固相化金属亲和层析的原理是利用暴露的蛋白质残基和介质上的金属离子之间的相互作用进行纯化[29]。作为电子供体的表面氨基酸，特别是组氨酸，与金属离子螯合时，在金属亲和柱内含这些氨基酸残基的蛋白质就受到阻滞。由于电子供体一定是未质子化的，至少部分是如此以便螯合金属离子，所以越碱性的溶液蛋白质与金属亲和柱结合越强。

为了能和蛋白质相互作用，固相化的金属离子必须是易于接近的。这种可接近性是这样实现的。从介质伸出一些亲水的臂，其末端与金属形成复合物。市售的、典型的用于金属螯合的介质是亚氨基二乙酸（IDA）。当需要更紧的蛋白质-金属结合时，羧甲基乙二胺（TED）Sepharose 也是可以用的。如果几乎没有关于将要纯化蛋白质特性的信息，则铜是首选试用于金属亲和柱的金属。常用的其他金属有镍、锌、钴和钙。没有一个现成的方法可以用于选择最佳金属离子，只能推荐反复试验筛选。在金属亲和层析过程中，应用高盐溶液（0.5～1mol/L NaCl）可以减少非特异离子相互作用。此外，在蛋白质结合前和过程中一定要避免金属螯合剂（EDTA、EGTA 和柠檬酸盐）。

12.3.5.1 操作步骤

装填介质

1) 10ml IDA-Sepharose 6B 装填一个柱子。柱长与柱径比例可随目的蛋白结合的紧密程度不同而变化。结合较紧的目的蛋白用短而粗的柱子就能很好地分离；
2) 3 倍柱床体积的水洗柱；
3) 3 倍柱床体积的 1mg/ml $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 洗柱；
4) 5 倍柱床体积的层析缓冲液（20mmol/L，pH7.5 磷酸钠盐缓冲液，0.5mol/L NaCl）洗柱；
5) 用层析缓冲液处理蛋白质样品液，即用该缓冲液透析或 1:1 稀释。再经离心或过滤获得澄清的样品液。介质结合容量决定柱子的有效载样量，通过试验测定柱子的总结合容量是非常有用的。通常结合容量的合理估计是每 ml 介质结合 10～100mg 蛋白质；
6) 将样品液（蛋白质浓度 1～10mg/ml）上样到金属亲和柱；
7) 5 倍柱床体积层析缓冲液洗柱，或洗至 A_{280} 值回到基线；
8) 5 倍柱床体积洗脱缓冲液（100mmol/L，pH5.0 乙酸钠，0.5mol/L NaCl）洗脱目的蛋白；
9) 含 50mmol/L EDTA 的层析缓冲液既可用于洗脱较强结合的蛋白质，也可用于柱子的再生。

- 另一个洗脱策略是金属结合竞争法，例如增加咪唑[34]、组氨酸、甘氨酸或氯化铵的浓度，从而与目的蛋白竞争金属离子结合位点达到洗脱目的。促溶剂（脲）或去垢剂也有助于强结合蛋白质的洗脱。
- 浓度梯度洗脱也可试用来代替上面介绍的洗脱步骤。

12.3.5.2 讨　论

1) 变动金属离子的用量能获得不同的纯化结果。一般来讲，使用仅占据 1/3 到 1/2 金属结合容量介质装填的柱子是最好的。这样的柱子因为有空余的金属结合部位所以金属渗漏可以减少到最低限度。

2) 通过降低 pH 值洗脱时，既要保证不使目的蛋白变性，也要防止引起等电点沉淀。此外，要注意低 pH 时 IDA-Zn^{2+} 和 IDA-Co^{2+} 介质会变得不稳定[29]。

12.3.6 疏水作用层析

疏水相互作用层析是以介质疏水基团和蛋白质疏水区域间的亲和作用为基础的。疏水力是浸在一种极性液体（如水）中的非极性物质的排斥力。胞膜蛋白都具有一个明显的疏水区域以锚定在膜上。可溶性蛋白质在外表面上可能存在疏水小区，它促进蛋白复合物的形成，也可能是疏水配基结合部位或活性部位。这些暴露的疏水区对疏水层析纯化而言是非常理想的[17,25]。尽管疏水层析利用相对非特异的亲和力分离纯化蛋白质，而且不具有高分辨率，但是该法很有用，因为其原理与其他层析技术不同。

在疏水层析的主要支持介质上含有大小不等的疏水侧链，烷基或芳香基，可是绝大多数情况起作用的是苯基或辛基（见图 12.3）。当碳氢链长度增加，即变得更疏水时，疏水强的少量蛋白质被吸附。这时疏水相互作用太强，需用极端方法洗脱，可能会导致蛋白质变性。苯基琼脂糖比辛基琼脂糖疏水性低，是疏水纯化中效果不错的常用介质，尤其是试用于纯化开始时。

疏水相互作用介质

苯基琼脂糖　$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-C_6H_5$

辛基琼脂糖　$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-(CH_2)_7-CH_3$

溶液盐浓度增加时疏水作用变得更强。因此，大多数疏水层析程序都是高盐时上样，降低盐浓度时洗脱。所以在硫酸铵沉淀

或离子交换层析后可以方便地直接进行疏水层析纯化。温和的洗脱条件及高蛋白质结合容量（10～100mg/ml）使疏水层析在蛋白质纯化中成为很有价值的方法，也是更换缓冲液的方法之一。

12.3.6.1 操作步骤

下述方案设定样品是在75%硫酸铵沉淀后溶在50%硫酸铵溶液的情况。

1） 装填5ml苯基琼脂糖CL-4B进入柱内；
2） 10倍柱床体积层析缓冲液（20mmol/L，pH7.0磷酸钠盐，50% 硫酸铵）洗柱；
3） 调整样品液符合要求，即在pH7.0磷酸钠缓冲液中含50%硫酸铵。上样总蛋白量200～500mg；
4） 3倍柱床体积层析缓冲液洗柱或洗至A_{280}值回到基线；
5） 用分步梯度法洗脱。每步依次分别采用两倍体积各含40%、30%、20%、10%或0%硫酸铵的pH7.0磷酸钠缓冲液洗脱；
6） 再依次用5倍体积水、5倍体积1mol/L NaCl和5倍体积水洗柱，使其获得再生。

12.3.6.2 讨　论

1） 与苯基琼脂糖结合弱的蛋白质换用辛基琼脂糖也许能获得较强的结合。
2） 特异性洗脱可以用辅助因子、底物、抑制剂或金属离子等。
3） 替代洗脱方法还有利用渐增浓度的极性弱化剂（如30%～75%的乙二醇或乙醇）、促溶离子、非离子型去垢剂（如Tween-20或Triton X-100）或变性剂(1mol/L尿素)。此外，增加pH或降低温度也能减少结合。注意极性弱化剂有引起蛋白质变性的倾向。
4） 蛋白质在接近其等电点时具有最大的疏水性。因而溶液

pH 远离等电点时该蛋白质的疏水结合力降低。

5) 更有效的洗脱也许是同时采用两种原理的洗脱方法，例如降低盐浓度和增加极性弱化剂浓度。

6) 梯度洗脱可能会改善分辨率。

7) 如果介质疏水性太强也可能与蛋白质发生不可逆结合。预先进行小规模试验有助于防止这样的事发生，以避免蛋白质过多丢失。

8) 因为疏水相互作用是相对非特异的，蛋白质可能吸附到介质的几个不同部位，于是造成不规则的洗脱。

9) 疏水柱经再生后，通常一共可用 20～30 次。

10) Kennedy[17]、Roe[25]和 Shaltiel[28]等分别介绍了疏水柱的洗脱策略和再生。

参 考 文 献

[1] Alberts, B. and G. Herrick.. 1971. DNA-cellulose Chromatography. Meth. Enzymol., 21: 198～217.

[2] Walker, J. M. ed. 1988. Production of Antibodies Using Proteins in Gel Bands. in New Protein Techniques. New Jersey: Humana Press. 355～362.

[3] Walker, J. M. ed. 1988. Dye-Ligand Chromatography. New Protein Techniques. New Jersey: Humana Press, 111～122.

[4] Arndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M., Baehr, W., Frischauf, A. M., and M. Marquardt. 1975. Covalent Attachment of DNA to Agarose: Improved Synthesis and Use in Affinity Chromatography. Eur. J. Biochem., 54: 411～418

[5] John Wiley & Sons, F. M. Ausubel, et al. eds. 1994. DNA-protein interactions Section 12. Current Protocols in Molecular Biology. New York.

[6] Brahimi, K, J. L., Perignon. M. Bossus, H. Gras, A. Tartar, and P. Druihle. 1993. Fast Immunopurification of Small Amounts of Specific Antibodies on Peptides Bound to ELISA Plates. J. Imm. Meth., 162: 69～75

[7] Coligan, J. E., A. M., Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober eds. 1992. Current Protocols in Immunology. New York: John Wiley & Sons.

[8] Fried, M. and D. M. Crothers. 1981. Equilibria and Kinetics of Lac Repressor-oper-

ator Interactions by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Nucl. Acids Res., 9: 6505～6523

[9] Galas, D. J. and A. Schmitz. 1978. DNAase Footprinting: A Simple Method for the Detection of Protein-DNA Binding Specificity. Nucl. Acids Res., 5: 3157～3170.

[10] Gerard, C. 1990. Purification of Glycoproteins. Meth. Enzymol., 182: 529～539.

[11] Gullick, W. J. 1988. Production of Antisera to Synthetic Peptides. In J. M. Welker ed. New Protein Techniques, New Jersey Clifton: Humana Press, 341～354.

[12] Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

[13] Hornby, D., K. Ford, and P. Shore. 1992. Purification of DNA Binding Proteins by Affinity and Ion Exchange Chromatography. Zn A. Kenney and S. Fowell eds. Practical Protein Chotmatogtaphy, Meth. Mol. Biol. Vol. 11: 273～285.

[14] Kenney, A. and S. Fowell eds. 1992. Immunoaffinity Chromatofraphy . Practical Protein Chotmatogtaphy,. Meth. Mol. Biol. Vol. 11: 125～133.

[15] Jarrett, H. W. 1993. Affinity Chromatogrphy with Nucleic Acid Polymers, J. Chrom., 618: 315～339.

[16] Kadonga, J. T. 1991. Purification of Sequence-specific Binding Proteins by DNA Affinity Chromatography. Meth. Enzymol., 208: 10～23.

[17] Kennedy, R. M. 1990. Hydrophobic Chromatography. Meth. Enzymol., 182: 339～343.

[18] Walker, J. M. ed. 1988. The Design. Preparation and Use of Immunopurification Reagents. New Protein Techniques. Clifton: Humana Press.

[19] Lotan, R. and G. L. Nicolson. 1979. Purification of Cell Membrance Glycoproteins by Lectin Affinity Chromatography. Biochem. Biophys. Acta, 559: 329～376.

[20] Lowe, C. R. and J. C. Pearson. 1984. Affinity Chromatography on Immobilized Dyes. Meth. Enzymol., 104: 97～113.

[21] Walker, J. M. ed. 1994. Preparation of Purified Immunoglobulin G (IgG): Basic Protein and Peptide Protocols. Meth. Mol. Biol., 32: 407～432.

[22] Kenney, A. and S. Fowell eds. 1992a. Selection of Antibodies for Immunoaffinity Chromatography: Practical Protein Chromatography: Meth. Mol. Biol., 11: 135～171.

[23] Kenney A. and S. Fowell eds. 1992b. Some Alternative Coupling Chemistries for Affinity Chromatography: Practical Protein Chromatography. Meth. Mol. Biol., 11: 173～196.

[24] Pharmacia. 1993. Affinity Chromatography: Principles and Methods.

[25] Harris E. L. V. and S. Angal eds. 1989. Separation Based on Structure. Protein Purification Methods: A Practical Approach. Oxford: IRL Press.

[26] Scopes, R. K. 1994. Protein Purification: Principles and Practice Third Edition. New York: Springer-Verlag.

[27] Kenney, A. and S. Fowell eds. 1992. Biospecific Affinity Elution . Practical Protein Chromatography. Meth. Mol. Biol., 11: 209~221.

[28] Shaltiel, S. 1984. Hydrophobic Chromatography. Meth. Enzymol., 104: 69~96.

[29] Sulkowski, E. 1985. Purification of Proteins by IMAC. TIBTech., 3: 1~7.

[30] E. L. V. Harris and S. Angal eds. 1989. Lectin Affinity Chromatography. Protein Purification Methods: A Practical Approach. Oxford: IRL Press.

[31] Thomas, T. C. and M. G. McNamee. 1990. Purification of Membrane Proteins. Meth. Enzymol., 182: 499~520.

[32] Kenney, A. and S. Fowell eds. 1992. Lectin Affinity Chromatography. Practical Protein Chromatography. Meth. Mol. Biol., 11: 81~89.

[33] Walker, J. M. ed. 1988. Antibody-Enzyme Conjugate Formation. New Protein Techniques, New Jersey, Clifton: Humana Press. 373~382.

[34] Kenney, A. and S. Fowell eds. 1992. Immoblized Metal Ion Affinity Chromatography. Practical Protein Chromatography. Meth. Mol. Biol., 11: 17~31.

柳 川

第十三章　蛋白质的晶体培养——悬滴结晶

13.1　引　　言

生物大分子 X 射线晶体学是揭示分子结构与功能关系的科学。要进行 X 射线晶体结构分析，必须要得到适合于结构分析的晶体[4]。第一，晶体内部结构要具有有序性，是单晶而非孪晶；第二，晶体要有一定的大小和形状。因为晶体衍射线的强度大体上正比于晶体的体积，反比于分子量。一般分子量为 50 000D_a左右的蛋白质分子需要 0.3mm^3 或更大的晶体以进行高分辨率的结构分析。分子量越大，所需晶体体积就越大。为满足上述要求，首先要使生物大分子结晶，再设法使其长大[3]。

蛋白质结晶过程像其他小分子物质一样，是一个有序化过程，即在溶液中处于随机状态的分子转变成有规则排列状态的固体。一般认为要使这种有序化过程开始，必须要形成一定大小的晶核，并使分子不断的结合到形成的晶核上。而蛋白质溶液能开始形成晶核，就必须使溶液达到过饱和，并保持一定条件，使溶液中的分子失去自由运动的能量（平移、旋转）而结合到晶核上，形成新的稳定化学键（次级键），使体系能量降低形成晶体。

蛋白质等生物大分子的结晶比一般小分子化合物的结晶要困难的多，这是由于这些大分子的分子量很高，几何形状较复杂，表面电荷多种多样，因此分子间相互作用或相互结合的点很多，而可能形成有序排列的关键结合点和几何匹配位置又很少，在外界条件（如 pH 值、温度不同溶剂等）的影响下，分子构象容易产生某些变化；同时在大分子结晶时，又必须保持在水和状态，

或者在生理 pH 值和温度条件下。因此，一般小分子结晶的方法都不适合应用于大分子的晶体生长，从而使得生物大分子的晶体培养工作相当困难。然而，在蛋白质的晶体培养方面，经过长期的努力已积累了许多成功的经验，对蛋白质的纯化、溶解、结晶和生长等方面也进行了许多理论和实验研究。长期以来很难培养出单晶的膜蛋白也已培养出了适合于 X 射线分析的晶体。但是从总体方面来说，生物大分子的晶体培养仍然是摸索性和经验性的，在某种程度上还要靠机遇。晶体培养已成为当前阻碍提高晶体结构分析速度的关键性问题。为此人们正在做进一步的努力。在物理学方面，正在研究生物大分子的结晶生长的复杂机理；在自动化方面，已设计和使用了由计算机控制的蛋白质结晶系统；在微重力条件下的晶体生长研究也已引起了学者们的兴趣和重视[5]。

培养蛋白质晶体最重要的是分离、纯化并获得均一的样品，一般要求电泳纯。然后使溶液达到过饱和这样蛋白质才可能开始结晶。蛋白质溶液的饱和度随溶解性的变化而变化，而溶解形式与蛋白质的浓度、离子强度、温度、pH 值、加入的有机溶剂以及与蛋白质结合的异电荷离子等因素有关。通过改变这些因素可以减少蛋白质的溶解度，最后使溶液达到过饱和。而过饱和是一种不稳定的状态，在这种状态下产生晶核，其中一些晶核生长成大的晶体。从不稳定状态向稳定状态的转化可以加以控制，从而达到产生较少的晶核以长出大的晶体。关键是控制过饱和度的量和速度，过饱和度要低，而速度要尽可能的慢，一般要 1～2 个月的时间，甚至一年以上。

本章介绍的悬滴结晶法适用于微量筛选结晶条件。每个蛋白质溶液的样品只需 5μl 或 10μl，平衡液只需 1ml，实验可采用 24 孔组织培养板进行。此法的原理是将含有使某种蛋白质结晶所需盐浓度的溶液与含有略低于这种盐溶液浓度的相应溶质的蛋白质溶液在一个密封体系内一起蒸发扩散，最后达到平衡而使蛋白质溶液内盐浓度提高，降低蛋白质的溶解度，达到过饱和而结晶。

悬滴法是蒸汽扩散法中一种通用性技术，在实践中较为成功，同时也便于初学者掌握。

13.2 悬滴结晶法

13.2.1 结晶原理

13.2.1.1 蛋白质晶体的生长

蛋白质在水中的溶解度由其氨基酸构成和体系的温度，pH值，其他溶质等诸多因素决定。当某种蛋白质溶液的浓度高于它的溶解度时，它就过饱和了。此时，蛋白质生成聚合物离开液相，形成不溶相[1]。聚和发生于两个不同的阶段-晶核形成期及晶体生长期。在晶核形成期聚合的蛋白质分子形成稳定的复合物，具体形式为无序、无定形沉淀或微晶。其他的蛋白质分子通过扩散作用运动到这些形成晶核的复合物表面，与之结合构成晶体生长相。

13.2.1.2 生成晶体的最佳条件

使不溶相构成形式为晶体而不是无定形沉淀的因素尚未完全明了。大多数晶体的形成依赖于所有影响此种蛋白质溶解度的因素的系统性改变，对生成晶体最佳条件的选择至今仍停留在经验水平上。当蛋白质高度过饱和时将以无定形沉淀为主要析出形式，而且晶体的成长速度远慢于无定形沉淀的生成速度，所以在提高蛋白质浓度使其过饱和时若速度太快，无定形沉淀也会先析出（图 13.1）. 故培养晶体的一般方法为将蛋白质的浓度尽量缓慢提高至略高于其溶解度即可。

13.2.1.3 提高蛋白质浓度至饱和

如图 13.1 所示，使蛋白质溶液达到饱和的手段有两种，提高蛋白质在体系中浓度（一般通过蒸发溶剂获得）和降低蛋白质的溶解度。虽然如改变 pH 值或温度等一系列化学、物理方法可

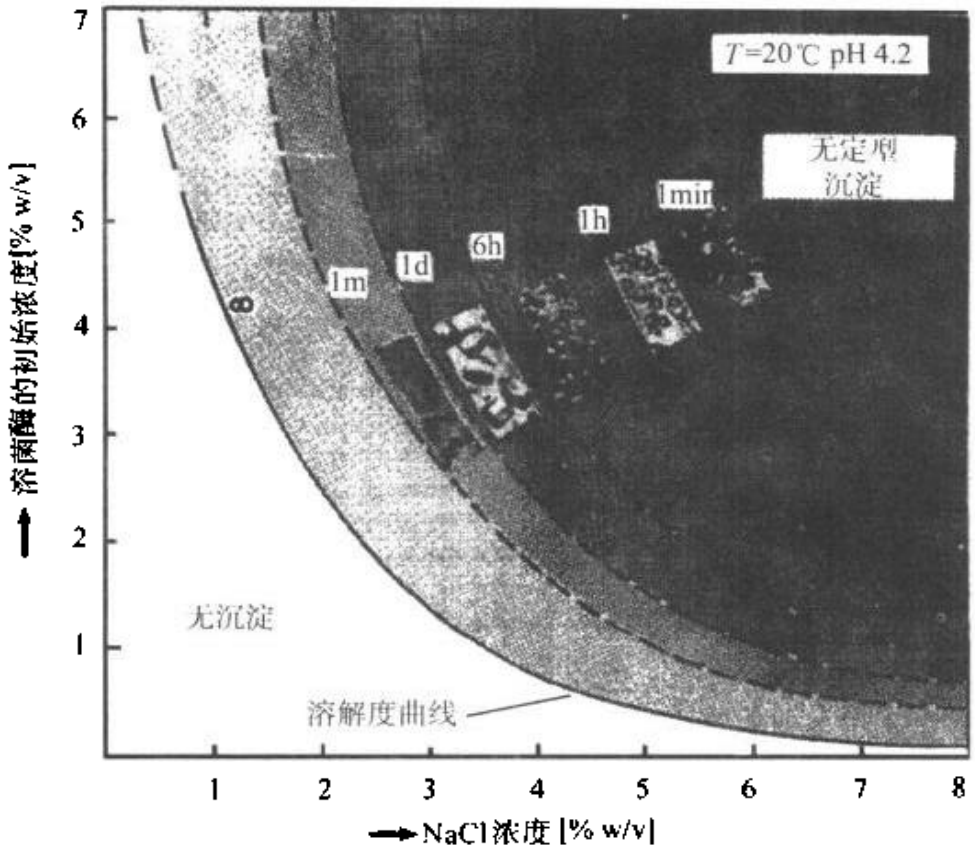


图 13.1　蛋白质浓度与盐浓度对溶菌酶结晶影响的动力学过程。无定形沉淀在蛋白质与盐浓度高时迅速生成。蛋白质与盐浓度较低时晶体在长时间内不断长大。但只要蛋白质浓度低于溶解度就不会有不溶相出现

以降低蛋白质的溶解度，但现今结晶蛋白质的主要方法是沉淀剂法，也叫沉淀法。悬滴法对于降低蛋白质溶解度就切实有效，因为它是蒸发（蒸汽扩散）和沉淀剂法的混合手段。

13.2.1.4　用于蛋白质结晶的沉淀剂

沉淀剂有盐类和有机类两种类型，它们的作用完全不同。盐类沉淀剂破坏蛋白质的水化层；减小蛋白质与水的结合能力；增大蛋白质与蛋白质的结合能力。有机类沉淀剂的基本功能是降低溶质的介电常数使它们之间的静电排斥力与它们的极性减弱[17]。各种沉淀剂的目的都是增大蛋白质之间的吸引力；促进构成晶体

的键的生成。

几种有机沉淀剂在实践中很有用，因为它们不像其它许多有机沉淀剂那样会使蛋白质变性，如 2-甲基-2，4 戊二醇（MPD）和聚乙二醇（PEGs）。聚乙二醇是一种特别的有机沉淀剂，因为它们是很大的聚合体。它们可以降低溶质的介电常数，而且他们表现出可影响水的化学形态的能力[18]。晶体学级的 PEGs 产品是各种长度聚乙二醇的混合物在精馏成几种分子量相差数百或数千的馏分后，根据其平均分子量（200～20000Da）出售（注意：PEGs 会被醛类、过氧化合物和一些阴离子污染）。相应的也有一些净化手段[14,24]。最近，发现了其他几种可用于蛋白质结晶的新“聚合物沉淀剂”，这将会带动一系列沉淀剂的发现[23]。

表 13.1 列出了一些用于结晶蛋白质的沉淀剂。常用于获得大分子结晶的有：硫酸铵、PEGs、磷酸盐缓冲溶液、氯化钠、MPD 和氯化镁[20]。要注意的是，MPD 是最近才用于蛋白质结晶的，是否有效尚未肯定。实际上几种沉淀剂的混合使用是很有效的。

表 13.1　用于结晶蛋白质的沉淀剂*

盐　类	有机类沉淀剂
醋酸铵	丙酮
柠檬酸铵	二氧杂环乙烷
硝酸铵	二甲亚砜
硫酸铵	叔丁醇
柠檬酸盐	乙醇
硫酸钙	葡萄糖
氯化锂	谷氨酸
硫酸锂	异丙醇
氯化镁	甲醇
硫酸镁	MPD
磷酸盐	1，3-丙二醇

续表

盐　类	有机类沉淀剂
硼酸钾	正丙醇
硝酸钾	
磷酸钾	**聚合物类沉淀剂**
磷酸钾钠缓冲液	聚丙烯酸（Mr 不定）
酒石酸钾	羧甲基纤维素
氯化钠	PEGs（Mr 不定）
柠檬酸钠	PEG8（2 000）
碘化钠	二甲基乙醚
硝酸钠	聚乙二醇（P400）
磷酸钠	聚乙烯醇（15 000）
硫酸钠	聚丙酮酸乙烯酯（K15）

*引自文献［8］、［17］、［23］

13.2.1.5　蛋白质结晶条件的选择

蛋白质结晶实验通常在两个阶段进行。首先在各种条件下（包括沉淀剂的使用和其他溶解成分的变化）测定蛋白质的溶解度。单在这一阶段就想获得可供衍射实验的晶体是很难的。这一步的真正目的是确定蛋白质不可溶的临界条件。这一阶段内，蛋白质过饱和时常以无定形沉淀的形式析出。这意味着形成蛋白质晶体的条件是非常苛刻的（图 13.1）。第二阶段是寻找最优结晶条件，即对第一阶段所提供的条件进行系统的微小的修改使得达到过饱和的过程更加缓慢，晶核的形成因此成为可能[6]

13.2.2　第一阶段操作步骤

在稀疏基质前提下通过对 pH 值、溶解盐成分、沉淀剂和缓冲溶液的种类等基本条件的筛选以获得一批可能适于结晶蛋白质的体系[13]。在这一步，确定一组沉淀剂－缓冲溶液体系，以作

为结晶体系筛选的起点。这一工作的基础是经验假设，最适于进行筛选的条件是已用于结晶过其它蛋白质的，尤其是与样品结构相近的蛋白质的条件[6]。两组不同的供筛选稀溶液基质可从 Hampton Research 公司提供的说明书中查到[11]。

悬滴结晶法一般在 24 孔的组织培养板上进行（图 13.2）。这种培养板易于组装、储藏和在实验中观察。在一些准备步骤之后，将显微镜盖玻片用蜡、脂密封在培养板孔中的真空环境里，盖玻片上即为样品溶液滴。

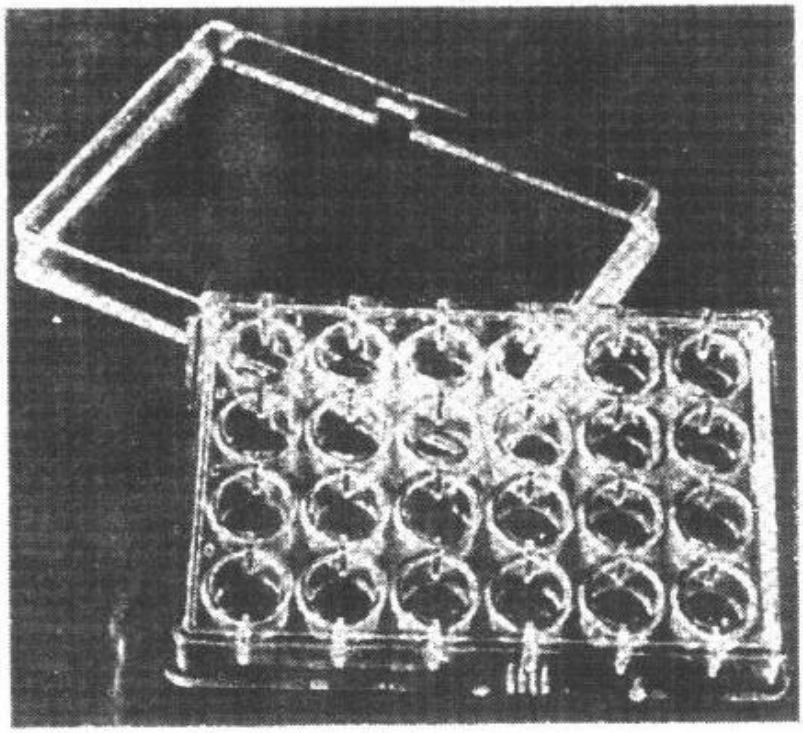


图 13.2　用于悬滴结晶试验的组织培养板。引自文献[18]。

13.2.2.1　盖玻片的预处理

蛋白质会浸润盖玻片，这种浸润会使样品液滴平铺从而减小晶体的体积。这种平铺还会破坏蒸发的均匀性；增加样品暴露于空气中的面积。蛋白质晶体也会粘连于盖玻片的表面，难于完整

的取下。因此，盖玻片在实验前应硅化处理。

这一步骤在实验前完成即可。

（1）仪器设备

2.2 厘米直径圆形玻璃盖玻片

镊子

Whatman 3Mm 滤纸

（2）试剂

PROSIL-28 标准有机硅溶剂

氢氧化钠溶液

显微镜玻璃清洁剂

（3）操作步骤

1）浸泡盖玻片于氢氧化钠稀溶液中或清洁剂洗液中过夜，用水洗净后凉干。

2）稀释 1mlPROSIL-28 于 100ml 水中。

3）浸泡盖玻片于 PROSIL-28 溶液中 1min，取出盖玻片，在去离子水中润洗 1min。

4）置盖玻片于大张 Whatman 3MM 滤纸上，用双层滤纸吸干其上表面，室温晾干或在 100°C 烘箱中烘干

（4）注意

- 硅化盖玻片已商品化。
- 硅化盖玻片应保存在无尘条件下，但不太受温度变化影响。
- 硅化盖玻片可用高温灭菌。
- PROSIL-28 稀溶液 24h 内有效，当溶液出现白色沉淀时即失效。
- PROSIL-28 易吸水变质，打开后一个月即不能再用，但若储存于完全干燥的环境中则可保持一年。若出现白色沉淀，则决不能使用。

13.2.2.2 蛋白质的预处理

尽量纯化蛋白质使之易于结晶，可利用双向电泳评估蛋白质的纯度，（第一方向应使用等电聚焦电泳或非均一pH梯度电泳）（见第七章）。单向SDS凝胶电泳（见第五章）无法区别目标蛋白质的异构体和其被翻译后的修饰蛋白质（分子量与目标蛋白质相同）。理想的蛋白质在被纯化后会马上结晶，但氧化和水解作用破坏其结构削弱了结晶作用，这并不是不可避免的。若蛋白质需储藏见1.6。

（1）蛋白质在结晶前的准备

这一程序需在临结晶试验前迅速完成。一般情况下，蛋白质需放入缓冲溶液中，浓缩后，离心分离除去细菌和凝聚蛋白质。原始缓冲溶液的浓度不应高于5mmol/l，使其不会在样品液滴中成为重要成分。

1）所有溶解蛋白质、缓冲溶液、沉淀剂用水均应为纯度最高的水，这是最为重要的。大多数结晶学实验室均有自己的水净化设备，如Millipore Milli-Q系统。最好不要把水置于容器中，这样水易于被污染。应从净水系统中直接取水使用。

2）通过透析法（见第四章）或凝胶过滤法（见第十一章）将蛋白质转移到适当的缓冲溶液中（表13.2）。其中凝胶过滤法可使用Bio-Gel P-60G或Sephadex G-25凝胶，也有专为1～2.5ml的小量样品准备的成品凝胶乳Pharmacia的PD-10。如蛋白质被硫酸铵沉淀，则需通过透析或稀释使其重新溶解。

3）在4℃环境下20000×g离心蛋白质10min除去变性的蛋白质。这样可防止其在下一步浓缩时堵塞超滤膜。

4）浓缩蛋白质至适当的可溶浓度，一般为5～30mg/ml（见第四章）。

5）再次离心以除去浓缩时可能产生的凝聚蛋白质。为防止

细菌的污染，用0.22μm孔径的薄膜过滤蛋白质，并将滤后蛋白质置于无菌容器中。如果有蛋白质损失，可将过滤孔径放大至0.45μm或0.65μm，但这种损失很可能意味着蛋白质发生凝聚了。

（2）注意

- 最适宜的结晶蛋白质溶液浓度范围通常是5～30mg/ml。
- 生物惰性的缓冲溶液一般都是优良的结晶蛋白质用缓冲溶液（表13.2）。

表13.2　结晶蛋白质常用缓冲溶液

缓冲溶液	pKa	pH值范围
醋酸-醋酸盐	4.76	4.2～5.3
柠檬酸-柠檬酸盐	5.40（pKa3）	4.9～5.9
MES	6.15	5.6～6.7
咪唑	6.95	6.4～7.5
HEPES	7.55	7.0～8.1
Tris	8.06	7.5～8.6
Bicine	8.35	7.8～8.9

13.2.2.3　晶体培养

（1）仪器设备

24孔无菌组织培养板

石蜡或橡皮泥

硅化2.2厘米直径圆形盖玻片（见13.2.1）

真空脂

10ml注射器和#10标准针头

平头镊子

体视显微镜

（2）试剂

准备好的蛋白质溶液（见13.2.2）

Hampton Crystal Screen Sparse Matrix Kit

Hampton Crystal Screen Ⅱ Sparse Matrix Kit（非必需）

（3）操作步骤

1）将24孔组织培养板开封，在每个孔反面编号，每一个孔对应筛选系列中的一个溶液。

2）做4个5mm直径的石蜡或橡皮泥球。打开培养板盖子，将球塞在板的四个角上（图13.3）。这些球的作用是减缓盖子对培养板的压力；防止因盖玻片与盖子直接接触而在拿下盖子时将盖玻片带下。任何起同样作用的其他材料均可使用。

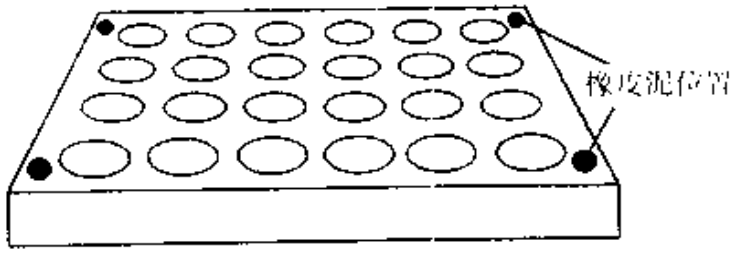


图13.3　石蜡或橡皮泥球放置位置

3）在每个孔中加入1.0ml沉淀剂-缓冲溶液。

4）将10ml注射器吸满真空脂。

5）注射器套上针头，在每个培养板孔边上画一个2mm宽的真空脂圈，圈应均匀连续。若真空脂严重堵塞针头可直接使用注射器，此时应注意真空脂溢出流入孔中污染溶液

6）将盖玻片放在干净的纱布上或滤纸上，只能接触其边缘。

7）用加样器移5μl蛋白质溶液于每个盖玻片中心处（见注意1）。

8）加入沉淀剂-缓冲溶液的操作如下：准备两只加样器，

第一只吸入5μl溶液第二只吸入9μl。将第一只加样器中的溶液加入蛋白质液滴中，形成一个更大的液滴。迅速用第二只加样器吸起液滴，反复吸吐2～3次以保证溶液混匀。若溶液黏度较大则应吸吐5～10次。第二只吸液管吸入9μl溶液而不是10μl可以避免空气的进入。溶液混匀后不能出现气泡，若有气泡，应用加样器赶净。

9）用镊子夹住盖玻片边缘，将其翻转，使液滴悬垂在盖玻片下。置盖玻片于培养板相应的孔上，保证盖玻片边缘将孔密闭。

10）用戴指套的手指将盖玻片均匀而有力的压合在孔上。盖玻片与孔结合要紧密，但按压不能过于用力，以免损坏盖玻片。装置示意如图13.4。

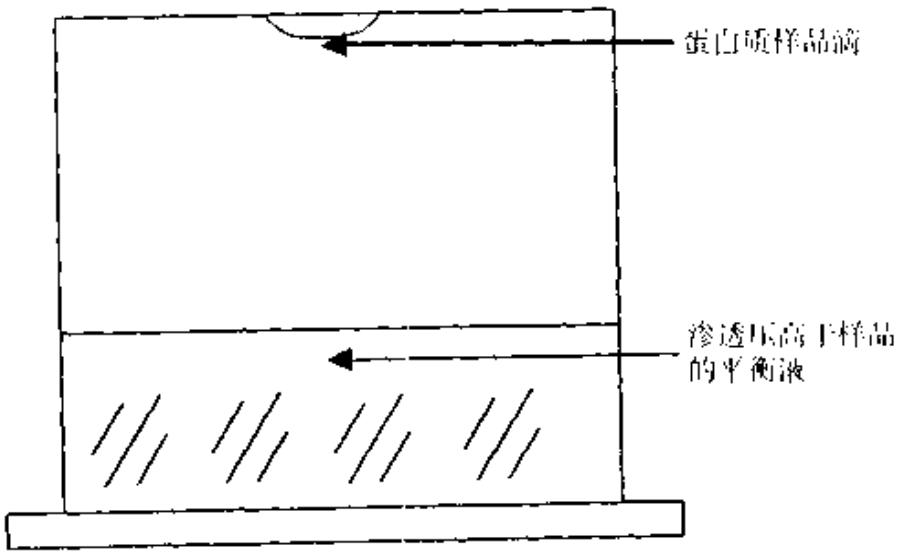


图13.4　悬滴法示意图

11）所有孔均处理完成后，轻柔的盖上盖子，板四角的石蜡球应能避免盖子与盖玻片接触。

12）晶体培养板处理结束后，可将其摞起，在适当温度下储藏。（见注意7及13.3.1.2）。储存处要求密闭、恒温且储架最好为滑行式抽屉，培养板忌震动。

（4）注意

- 样品总量最好在 5 ~ 20μl 之间。在早期的筛选试验中，最好进行小量试验。培养晶体时溶液量越大，就越利于大晶体的生成。
- 用体视显微镜观察每块刚处理好的培养板，很可能找到一些影响蛋白质溶解条件的线索。
- 翻转盖玻片时，保证液滴停留在盖玻片的中心。
- 盖玻片必须与孔上的真空脂完全紧密结合，若有缝隙，可通过轻轻旋转盖玻片抹平。任何缝隙都会使溶液蒸汽完全溢出。
- 蛋白质与沉淀剂一定要均匀混合为均相溶液。
- 在使用高浓度盐溶液作为沉淀剂时，细菌的污染不会很严重。但当沉淀剂为 PEG 等有机物时，情况就不同了。蛋白质中的细菌一定要在过滤时除净。商品沉淀剂是无菌的，开封时一定要辅以灭菌技术。组织培养板也是无菌的，加样器和盖玻片需高压灭菌。溶液中可加入小量的细菌抑制剂如 0.02% NaN_3（见 1.2）。问题是如果它们和蛋白质相互作用，就会影响结晶。含重金属离子的叠氮化合物不能加入溶液中，否则会形成暴露的金属叠氮化盐[27]。
- 条件允许的话，每个样品可做两份，一份置于室温，一份置于 4℃ 环境下。

13.2.2.4 试验观测

因为蛋白质晶体很不稳定，出现和消失都很迅速，所以有规律的纪录每个孔的试验现象就很重要。在培样板处理后应迅速开始观察；第二天再次观察；二到三天后作第三次观察；之后每周观察一次。最佳的观察仪器是体视显微镜。应注意的是观察时若发生晃动或振荡会抑制蛋白质晶体的发育。

（1）试验观测内容

1) 用于结晶的蛋白质没有任何变性和凝聚，故应为微蓝色透明溶液。与沉淀剂混合后，由于不定型沉淀的产生，就和其他含不溶物的蛋白质溶液一样了。混合几分钟或几小时，有时甚至几天后溶液开始呈现均一的淡灰色或微白色混浊。只要时间足够长，沉淀就会多到结成大块。一些沉淀剂的使用会产生更独特的沉淀，所以在筛选系列中相同的蛋白质也不会有相同的沉淀产生。

2) 晶体与不定形沉淀有明显区别。晶体是透明的，表面平滑。不定形沉淀不透明，没有规律的棱、面和形状。而且晶体大都有双重折射性质，将其在偏振光显微镜下旋转，可观察到明暗交替的现象。

3) 有时无定形沉淀会很有规则，这是由于其附着于晶体上造成的。有时当体系条件与适当的结晶条件相近时，无定形沉淀也会发生准结晶聚合。这种体系可能只需很小的改变就会成为合适的结晶体系了。规则的无定形沉淀可能也会出现直棱、双折射等现象。根据这种现象的重现及经验可用于鉴定产生这种非晶体沉淀的污染。

(2) 鉴定晶体是否为蛋白质

悬滴结晶试验中的缓冲溶液浓度通常很低，不会结晶。不过硫酸铵和磷酸钾钠缓冲液沉淀剂的浓度比较大，可能形成结晶。沉淀剂离子的加入，例如含钙离子磷酸缓冲溶液会加强这一作用。有机分子的加入会改变所有溶质的溶解度，也可能导致非蛋白质结晶。非蛋白质晶体一般生长迅速，而蛋白质晶体生长期则达数周、数月甚至更长。以下为几种鉴别蛋白质晶体的方法。以鉴别能力由弱至强排序。

1) 刮擦法：明火加热毛细管中部，拉断后制成玻璃针。将有结晶的盖玻片结晶向上置于体视显微镜下。用玻璃针或其它微量操作器刮擦晶体，蛋白质晶体很容易被刮为小碎片，而盐晶体则比较难。

注意 1：测试后装置可复原，所以不要暴露样品于空气中太长时间。

注意 2：蛋白质形成晶体后会包容很大一部分溶解状态蛋白质，所以应时刻保持晶体的湿润，培养孔中的溶液可维持适当的渗透压从而防止晶体溶解。晶体取出后可以包含液滴中的辅助离子和配体，但不能有孔中溶液的成分，这在取出晶体后的各步处理中均应注意。

2）脱水法：使晶体在空气中脱水，蛋白质晶体会粉碎，而盐晶体一般会保持完整。

3）凝胶电泳法：如果晶体足够大，可溶解之，用 SDS 凝胶电泳分析。一个 0.5mm 的立方晶体有大约 60μg 的蛋白质。这对于银染法 SDS 凝胶电泳是足够的。如果晶体体积小于 0.05μl，一次使用单晶量就将很大。将晶体溶于 1.5ml 离心分离管中的 100μl 培养孔用液中；10000×g 离心 15min；用另 100μl 培养孔用液润洗晶体；再离心；将晶体悬于 20μlSDS 凝胶样品缓冲液中；进行变性凝胶电泳和银染法测定。

注意 1：彻底洗去晶体中的可溶性蛋白是很重要的。晶体越大，信噪比越大，凝胶中的蛋白就越可能是晶体蛋白。

注意 2：润洗晶体时晶体可能会溶解。

4）染色结合法：Hampton Research 出销售“Izit Crystal Dye”，小量加入结晶液滴中，蛋白质晶体将被染为蓝色。

5）X 射线衍射法：这是最权威的鉴定手段，蛋白质微晶的周期性与盐微晶有明显区别。

13.3 设计最优结晶方案

本节讨论结晶方案的优化问题，针对已完成第二节所讨论的工作并得到以下三个结果后的情况。

1）已从筛选系列中的一个或几个样品中得到晶体。

2）观察到无定形沉淀或接近结晶的凝聚体。

3）有无任何现象发生的样品。

若有前两个现象发生，根据 13.3.1 部分微调试验方案；只有第三个现象发生，根据 13.3.2 部分微调试验方案。

13.3.1 稀溶液基质的微调

13.3.1.1 实例

筛选系列中存在若干沉淀剂-缓冲溶液的条件可使蛋白质不

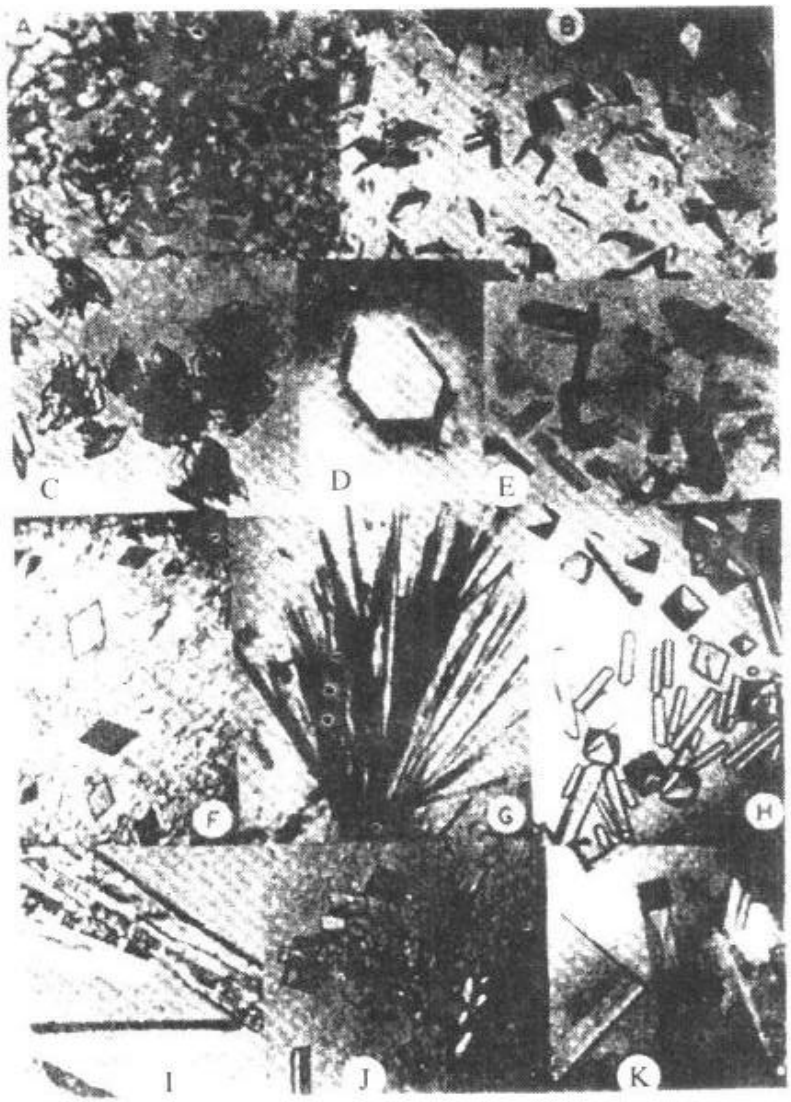


图 13.5　几种蛋白质晶体。(A) 鹿肝中的过氧化氢酶；(B) 火鸡肝中的果糖——1，6-二磷酸酶；(C) 豚鼠氢化可地松结合蛋白；(D) 伴刀豆球蛋白；(E) 牛肝中的过氧化氢酶；(F) 菠萝中的未知蛋白质；(G) 大肠杆菌延伸因子 Tu；(H) 酵母菌苯丙氨酸 tRNA；(I) 噬菌体 fd 片段上 Gene5 DNA 未修饰的蛋白；(J) 鸡雏肌肉中的三磷酸甘油酯脱氢酶，(K) 刀豆球蛋白。引自文献 [16]

溶的稀溶液基质。对每一个这种样品需在一定范围内对其 pH 质和各种溶质的浓度进行系统的微调。蛋白质的配体对结晶的影响也需进行测试

为减少样品测试数量，应从获得结晶的样品开始，再过渡到有接近结晶的凝聚体的样品和有无定形沉淀的样品。所有的样品均应进行微调，包括已有晶体出现的样品。因为多种形式的结晶和结晶条件有助于后期结晶学分析。

假设 Hampton 结晶筛选序列第 35 号样（0.1mol/L HEPES，pH 7.5；1.6mol/L 磷酸钾钠）在室温环境下一天后生成白色无定形沉淀，以此为基础可建立一个微调筛选系列。可设置磷酸钾钠缓冲液浓度分别为 0.8、1.0、1.2、1.4 mol/L，pH 值分别为 7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0，磷酸钾钠缓冲液浓度与 pH 值两两相配即得到 24 种新样品，可在一个组织培养板上进行测试（图13.5）。溶液应以 pH 值调节为主，沉淀剂调节次之

为找到适宜的结晶条件可能要经过几次重复的操作，需要很大耐心。结晶速度比沉淀慢很多，后者出现时间以分钟计而前者则以小时甚至周计。为得到一个漂亮晶体花数年时间也是不鲜见的

13.3.1.2 一般策略

（1）pH 值和缓冲溶液

1）蛋白质之间的相互作用是使蛋白质排入晶格的基本条件。这种作用主要是局部电荷引起的，依介电常数、pH 值和蛋白质结构变化而定[12]。pH 值的变化对蛋白质结晶有很大影响。

2）许多作为沉淀剂的盐类和有机物没有足够的缓冲容量，所以需加入其他成分作为缓冲剂。蛋白质纯化时使用的一些缓冲剂也适用于蛋白质结晶。为使溶液有尽量大的缓冲容量，缓冲剂的 pK_a 要尽量接近溶液 pH 值，所以 pH 值筛选范围很宽时变更缓冲剂就很必要了。合理的

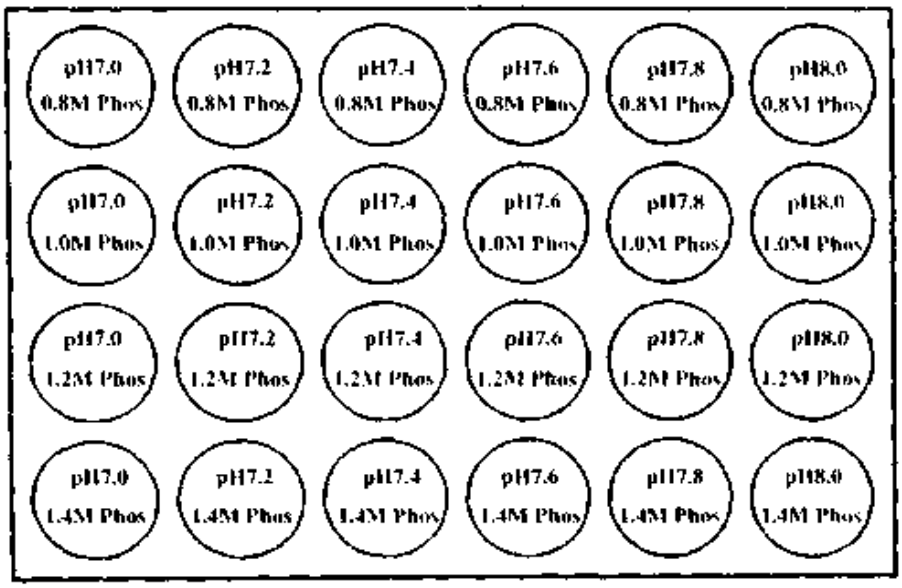


图 13.6　35 号样品 pH 值和磷酸钾钠微调

缓冲溶液浓度为 50～200mmol/L，这要比 13.2.2.2 记述的准备蛋白质时所用浓度高得多。

3）　文献记载蛋白质多在溶液 pH 值为 7.0 时结晶，以结晶形成率为纵坐标，溶液 pH 值为横坐标作图可得一钟形线，最高点即位于 pH 值为 7.0 处。但在 pH 值时低于 5.0 和高于 9.0 时也有很多晶体形成，所以在一个宽 pH 范围内优化结晶条件是必要的[26]。对某个样品，只在其前一步实验时出现沉淀或结晶点附近调节 pH 值是不够的。许多研究者将 pH 值初始调节范围定得很宽，对某种蛋白质的一种沉淀剂体系就可能做 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的测试样品。等电点处的 pH 值很有研究价值，因为此时蛋白质溶解度往往最小。

4）　虽然很难预测最佳 pH 值，但准确 pH 值的获得确实很重要。每 0.1 的 pH 值变化都可能对结晶产生很大影响。以下为准确设定 pH 值的一些手段。

注意 1：采用一个专用电极测量结晶溶液 pH 值，可避免使用不同电极带来的误差和向溶液中引入未知杂质的可能

注意 2：测量 pH 值时不要将电极插入样品液中，应取少量溶液测量，之后弃去。大多数电极会释放出钾离子、氯离子、甚至银离子等污染溶液

注意 3：通过计算得出缓冲剂的种类和加入量，一次性加入后用酸度计确定溶液 pH 值，这样可保证缓冲溶液 pH 值的重现性

（2）温度

0℃～4℃是大分子最适宜的结晶温度，几乎有 1400 种样品适合这一点[20]，低温结晶还有一些好处。大多数蛋白质在 4℃时比室温下溶解度低[16]也更稳定，易于保存。而且在悬滴结晶实验中，蛋白质和沉淀剂的浓缩速度在 20℃时比 3℃下要快 3～5 倍[22]，这就使蛋白质在溶液中溶解能力的变化要快很多。低温下更慢的溶解能力变化可使蛋白质有足够时间聚集为有序的晶体形式。室温操作可使程序简单化，尤其当缺乏低温设备时，也可以避免因温度变化导致对 pH 值的影响。可在 20℃～24℃下结晶的蛋白质也约有 800 种[20]。蛋白质结晶的操作温度选择依其稳定程度而定。

（3）蛋白质与沉淀剂的浓度

1）悬滴结晶的动力来自悬滴溶液与培养孔中溶液的渗透压差，孔中平衡液的渗透压较高，体积又比蛋白质悬滴溶液高几个数量级。实验时悬滴溶液中的水逐渐挥发，进入孔中溶液。初始条件的设定应使悬滴溶液在减少 25%～50%后可达到平衡点，而时间常在一天到一周之间[22]。在这一段时间内蛋白质低于饱和点并缓慢的达到和超过它。如果悬滴液中无沉淀剂，判断蛋白质溶解度最好的方法是观察蛋白质在浓缩到何时出现沉淀，这可由溶液出现混浊或产生散射确定。可将蛋白质溶液稀释为饱和浓度的 75%，封闭在蒸汽扩散室中重新浓缩达到平衡点。沉淀剂的加入使体系复杂化，它将决定蛋

白质的饱和点，所以找到蛋白质和沉淀剂的平衡是很重要的。

2） 实践中，在无沉淀剂时蛋白质的浓度最开始常选择维持稳定的最高限。尽管浓度从1到数百mg/mL时蛋白质均可能结晶，但蛋白质浓度一般都在5～30mg/mL之间[16]。沉淀剂的浓度应以蛋白质刚出现沉淀为准。

3） 伴随沉淀剂改变而变化的蛋白质的浓度作用是很大的，这在沉淀剂浓度很低时即可导致蛋白质沉淀和出现孪晶现象等晶体缺陷时也很有用。蛋白质浓度降低到最佳浓度之下会导致小晶体的生长。

4） 无论蛋白质浓度是否随其他参数改变，同其它溶质浓度一样，它的重现性是首要前提。蛋白质浓度的变化会改变其达到饱和的速率。对于可能影响蛋白质浓度的因素一定要计算清楚，尤其是可能将一个样品改变为另一个样品的某些因素。

（4）蛋白质配体和其他溶质

1） 金属离子、核苷酸、肽、酶底物和辅助因子都是结晶实验应考虑的重要因素。配体和辅助因子不仅可提高蛋白质的稳定性，而且有助于晶体形成也会起很大作用。例如肌动蛋白，它有聚集成丝状螺旋体的倾向，故在纯溶液中不会结晶。在脱氧核糖核酸酶Ⅰ、肌动蛋白抑制蛋白、凝溶胶素等蛋白质配体的存在下，它的凝聚被干扰，保持了单体状态，晶体才会形成[15]。另一个例子是Tu延长因子在加入GDP或一种GTP的类似物后会形成不同形态的晶体[2]。

2） 研究如何结晶某种蛋白质时，若已知其氨基酸序列，与之结构相近的蛋白质的成熟配体经验会是很好的参考。最近的一个对于同源蛋白的研究证明六种蛋白质均为黄素氧还蛋白（flavodoxin）的同源蛋白且均含有与黄素单核苷酸的结合位点[10]。

3) 一些特异性的配体、辅助因子和去垢剂、蛋白质稳定剂等其他溶液成分也是有助于结晶的[19,28]。

13.3.2 初始筛选的扩展

在使用 Crystal Screen 或 Crystal Screen Ⅱ 试剂盒进行筛选时未得到晶体和沉淀或者调整初始筛选系列未得到优良晶体都是可能的。这时对 50 到 100 个由 Crystal Screen 决定的初始筛选条件进行扩展就是必要的了。扩展可采用对几种沉淀剂建立几个筛选系列的方法，也可以采用文献记述的其他稀溶液基质建立筛选系列[6]。不过可供挑选的稀溶液基质尚未商品化，Hampton Research 只提供一些建立筛选系列的工具包。

13.3.3 蛋白质结晶的灵活性与困难

本节的内容只是对蛋白质结晶操作的简介，并不是成功的保证。更深入的结晶策略优化讨论将超出本书的范畴，读者可从引文找到更多的细节信息。

在本书所介绍的各项技术中，蛋白质结晶是最富创造性的。你可能会凭直觉想到一种辅助因子、化学修饰或突变就会稳定蛋白质或改变它的溶解度使其结晶。例如被期待已久的肌球蛋白 S1 头部的结构就是在将赖氨酸残基上的甲基全部去除后才得到的[25]。幸运的是，大量的蛋白质结晶不需要这么严厉的手段。

参 考 文 献

[1] Aradawa, T. and S. N. Timasheff. 1985. Theory of Protein Stability. Meth. Enzymol., 114: 49 - 77.

[2] Berchtold, H., L. Reshetnikova, C. O. A. Reiser, N. K. Schirmer, M. Sprinzl and R. Hilgenfeld. 1993. Crystal Structure of Active Elongation Factor Tu Reveals Major Domain Reatrangements. Nature, 365: 126 - 132.

[3] Blundell, T. L. and L. N. Johnson. 1976. Protein Crystallography. San Diego: Academic Press, Inc.

[4] Cantor, C. R. and P. R. Schimmel. 1980. Biophysical Chemistry. New York:

W. H. Freeman and Company.

[5] Carter, C. W. ed. 1990. METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, Vol. 1. Protein and Nucleic Acid Crystallization. San Diego: Academic Press, Inc.

[6] Cudney, B., S. Patel, K. Weisgraber, Y. Newhouse and A. McPherson. 1994. Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal Growth. Acta Cryst., 50: 414 - 423.

[7] Ducruix, A. and R. Giegé, eds. 1992. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press.

[8] Gilliland, G. L. and D. R. Davies. 1983. Protein Crystallization: The Growth of Large-Scale Single Crystals. Meth. Enzymol., 104: 370 - 381.

[9] Good, N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, K. M. Izana and R. M. M. Singh. 1966. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. Biochemistry, 5: 467 - 477.

[10] Grandori, R. and J. Carey. 1994. Six New Candidate Members of the α/β Twisted Open-sheet Family Detected by Sequence Similarity to Flavodoxin. Protein Sci., 3: 2185 - 2193.

[11] Hampton Research. Crystallization Research Tools (catalogue and technical bulletin). Three issues per year.

[12] Honig, B. and A. Nicholls. 1995. Classical Electrostatics in Biology and Chemistry. Science, 268: 1144 - 1149.

[13] Jancarik, J. and S. H. Kim. 1991. Sparse Matrix Sampling: A Screening Method for Crystallization of Proteins. J. Appl. Cryst., 24: 409 - 411.

[14] Lorber, B. and R. Giegé. 1991. Preparation and Handling of Biological Macromolecules for Crystallization. In A. Ducruix and R. Giegé eds. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach. Oxford: IRL Press, Oxford University Press.

[15] Mannherz, H. G. 1992. Crystallization of Actin in Complex with Actin - Binding Proteins. J. Biol. Chem., 267: 11661 - 11664.

[16] McPherson, A. 1982. Preparation and Analysis of Protein Crystals. New York: Wiley Interscience, John Wiley and Sons.

[17] McPherson, A. 1985a. Crystallization of Macromolecules: General Principles. Meth. Enzymol., 14: 112 - 120.

[18] McPherson, A. 1985b. Use of Polyethylene Glycol in the Crystallization of Macromolecules. Meth. Enzymol., 114: 120 - 125.

[19] McPherson, A., S. Koszelak, H. Axelrod, J. Day, R. Williams, L. Robinson, M. McGrath and D. Cascio. 1986. An Experiment Regarding Crystallization

of Soluble Proteins in the Presence of β-Octyl Glucoside. J. Biol. Chem. 261: 1969 - 1975.

[20] McPherson, A., A. J. Malkin and Y. G. Kuznetsov. 1995. The Science of Macromolecular Crystallization. Structure 3: 759 - 768.

[21] McRee, D. E. 1993. Practical Protein Crystallography. San Diego: Academic Press, Inc.

[22] Mikol, V., J. L. Rodeau and R. Giegé. 1990. Experimental Determination of Water Equilibration Rates in the Hanging Drop Method of Protein Crystallization. Anal. Biochem., 186: 332 - 339.

[23] Patel, S., B. Cudney and A. McPherson. 1995. Polymeric Precipitants for the Crystallization of Macromolecules. Biochem. Biophys. Res. Comm., 207: 819 - 828.

[24] Ray, W. J. and J. Puvathingal. 1985. A Simple Procedure for Removing Contaminating Aldehydes and Peroxides from Aqueous Solutions of Polyethylene Glycols and of Nonionic Detergents that are Based on the Polyoxyethylene Linkage. Anal. Biochem., 146: 307 - 312.

[25] Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Bäse, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg, H. M. Holden. 1993. Three-dimensional Structure of Myosin Subfragment-1: A Molecular Motor. Science, 261: 50 - 58.

[26] Rhodes, G. 1993. Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models. San Diego: Academic Press, Inc.

[27] Rozycki, M. and R. Bartha. 1981. Problems Associated with the Use of Azide as an Inhibitor of Microbial Activity in Soil. Appl. Env. Microbiol., 41: 833 - 836.

[28] Sousa, R. 1995. Use of Glycerol, Polyols and other Protein Structure Stabilizing Agents in Protein Crystallization. Acta Cryst., 51: 271 - 277.

[29] Wyckoff, H. W., C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff eds. 1985. Diffraction Methods for Biological Macromolecules. Orlando: Academic Press, Inc.

李 镭 汪家政

第十四章　cDNA 法推断蛋白质的一级结构

14.1　引　　言

蛋白质和多肽是由 20 种氨基酸按照一定的顺序通过肽键连接成一长链，再通过链内、链间的离子键、疏水作用等多种作用力进行折叠卷曲形成一定构象而产生其特异性的活性作用。蛋白质的一级结构即氨基酸的排列顺序，决定了蛋白质的高级结构及功能。因此，测定蛋白质的一级结构是进行蛋白质结构与功能研究中不可缺少的部分。随着研究方法和手段的更新，蛋白质一级结构的分析向提高灵敏度、缩短周期的方向发展。蛋白质一级结构分析方法主要有两种：①化学分析法，即直接进行肽链的拆分、裂解及氨基酸分析；②通过测定编码蛋白质的核苷酸顺序推测相应蛋白质的氨基酸顺序。后者是随着基因工程技术的发展而来的。它使蛋白质一级结构测定工作变得简单、快速而准确。对于分子量较大的、不易纯化的和含量极少的蛋白质尤其适用。

14.2　一般策略

14.2.1　蛋白质的纯化和肽段氨基酸序列分析

14.2.1.1　蛋白质样品的准备

进行序列分析的蛋白质样品，一般纯度要求大于 95%，通常是用色谱和电泳精制过的。

(1) SDS-PAGE 纯化的样品

从 SDS-PAGE 上分离的蛋白质必须经过特殊处理，使 SDS 浓度低于 0.0005%，否则 SDS 会影响到胰蛋白酶的

酶解，也会明显降低 HPLC 分离时的分辨力。在 SDS-PAGE 后，采用电印迹（bloting）转移到 PVDF 膜上[7]，是常用的方法，因为 PVDF 膜结合蛋白质能力的专一性远远超过它与盐、氨基酸和去垢剂的结合，因此能将蛋白质与这些杂质分开。经过这样转移的 PVDF 膜可直接用于化学裂解或酶解后的肽段氨基酸序列分析。

（2）HPLC 纯化的样品

如果样品是用反相 HPLC 纯化的，因为流动相是挥发性溶剂，在真空干燥或冻干样品时可被除去。如果蛋白质是用离子交换 HPLC 或疏水 HPLC 或凝胶过滤 HPLC 精制的，则样品要进行脱盐。关于脱盐或稀蛋白质溶液的浓缩可参考第四章。

（3）蛋白质样品中的二硫键和巯基

在蛋白质样品纯度达到要求，盐和小分子也已除净时，还要转变半胱氨酸残基或其他稳定的衍生物。因为半胱氨酸的巯基在分肽过程中易自动氧化成各种产物，包括形成无序的二硫键，因此需要将半胱氨酸残基先转变成稳定的衍生物。通常用碘代乙酸烷化，这个反应是快速和专一的；同时这类试剂保存在暗处是很稳定的。而且，这类试剂容易得到放射性标记物。蛋白质或肽在导入带电荷基团后也增加了它们在水溶液中的溶解度。

注意：碘代乙酸必须是无色的，有碘存在，呈淡黄色，会引起巯基迅速氧化，阻碍了烷化反应。

14.2.1.2 原位酶解和测序

将 SDS-PAGE 上的蛋白质样品从凝胶上分离出来是很困难的，目前流行的方法是将蛋白质电印迹（electrobloting）至 PVDF 膜上，直接进行序列分析或直接在膜上进行酶解，后者称为原位分析[4]。

操作步骤：

1）将膜片剪成 1mm 细条，放在 Eppendoff 管中；
2）加 1.2ml 0.5% PVP-40/0.1mol/L HAC，37℃，保温 30min；
3）用蒸馏水洗膜 5 次以上，洗净残留的 PVP-40；
4）用酶解缓冲液漂洗，然后进行酶解；
5）酶解：蛋白酶在 100mmol/L NH_4HCO_3：ACN = 95：5，pH8.2，37℃ 酶解过夜，对 V8 蛋白酶则在 100mmol/L 磷酸钠：ACN = 95：5，pH7.8，室温过夜。酶：底物1：10 至 1：20（W/W），对亚微克级样品，酶：底物高达2：1。酶解后 -20℃ 保存或立即用几微升 10% 三氟乙酸（TFA）酸化，上样到 HPLC 柱上分析。如果蛋白质纯品的量足够多时，可采用常规的化学裂解或酶解方法得到可供进行氨基酸序列分析的肽段。

14.2.1.3 注　　意

1）微克级蛋白质的操作，实验室内的温度，灰尘，纤维，皮肤汗液和头屑等都会影响结果。
2）容器及透析袋表面的吸附作用致使蛋白质严重损失。建议用微量透析仪器或小凝胶过滤柱脱盐。最好在硅化处理的小管中冻干或储存肽。
3）样品加样和转移时最好用玻璃微量注射器，以保取样量精确。
4）小体积的溶液先用简单离心使样品集中在底部，再进行操作。

14.2.2 引物的设计

在得到蛋白质部分氨基酸序列的基础上，通常采用设计简并性或偏性引物，用锚定 PCR 的方法来获得该蛋白质的 cDNA 部分或全长序列。现在许多公司推出的 RACE（rapidly amplication cDNA ends）系统的技术核心便是如此。

简并性引物的设计一般遵循以下几个原则：

1）具有高度特异性：根据所得到蛋白质的部分氨基酸序列，在数据库内进行检索，找出较为特异的一段作为设计引物的模板。在互联网上常用的数据库如：GenBank 的 PDB（protein data base），SwissProt 等。

2）简并度是指每一个位置上碱基数的乘积。一般认为一条简并性引物的简并度不应大于 100。

3）降低引物的简并度：可以用“I（次黄嘌呤碱基）”来代替，因为理论上 I 可以与任何一种碱基配对。但 I 一般应尽量远离引物的 3′端。而且如果 3′末端出现简并性的碱基，则应包括所有可能的碱基，因为 3′末端碱基的错配会导致 Taq 酶作用延伸反应不能进行。还有一种降低引物简并度的方法是在扩增人的基因时，可以根据偏性密码子来代替高度简并的碱基位置，即猜测体（guess-mer）。

4）其他则应遵循非简并性引物的设计要求：引物长度为 19～24个碱基，G+C 的含量应在 40%～60%之间，3′末端的碱基最好为 G 或 C，而不要是 A、T 或 I，引物序列中应避免出现重复的互补结构等。

现在设计引物的程序及软件繁多。常用的如：Oligo5.0、Primer2.0 等。都可以帮助快速有效的进行引物设计。简并性碱基的代表符号见表 14.1。

表 14.1　简并性碱基的代表符号

符　号	代表碱基	符　号	代表碱基
A	A（腺嘌呤）	C	C（胞嘧啶）
G	G（鸟嘌呤）	T	T（胸腺嘧啶）
R	A 或 G	Y	C 或 T
K	G 或 T	M	A 或 C
S	G 或 C	W	A 或 T
B	G、C 或 T	D	A、G 或 T
H	A、C 或 T	V	A、C 或 G
N	A、G、C 或 T	I	次黄嘌呤

14.2.3 用 PCR 扩增目的 cDNA 片段

PCR（polymerase chain reaction）作为一种常用的分子生物学实验手段，已非常成熟。各个公司推出了各种高保真和高效率的聚合酶及成套的 PCR 试剂盒，使得 PCR 技术简便而且有效。但通常应注意以下几点：

1）方法的选择：对于两端序列已知的情况，可根据两端序列设计引物，选用普通的 PCR 方法。对于只知道一端序列的情况，可使用 RACE（rapidly amplication cDNA ends）技术，RACE 分为 3′和 5′两种（Gibco 公司），也有从两端同时进行扩增的 RACE（Clontech 公司）。

2）PCR 扩增的模板：PCR 扩增的模板通常是指由 mRNA 逆转录而来 cDNA 第一链。PCR 模板量的多少直接影响到扩增的结果。在逆转录过程中，通常会加入一些接头（universaladaptor），以便进行 PCR 的单引物扩增（锚定 PCR）。

3）PCR 扩增的特异性：决定 PCR 扩增特异性的因素很多，但通常有以下几点：①一般认为 PCR 反应所需的 mRNA 模板量仅为 1μg。增加模板量可以提高扩增效率，但同时也使非特异产物增加。②PCR 中所使用的 Taq 酶通常有错配现象，出现频率约为 0.2%～0.5%。所以可以使用一些具有 3′～5′外切酶活性的高保真聚合酶，如 Pfu 酶、Vent 酶（Biolab）及 Pyrobest 酶（Takara）等。③通常认为增加退火温度及减低 Mg^{2+} 浓度可以提高扩增的特异性 ④在 PCR 体系的操作中，将模板最后加入体系中及热启动等方法可以提高扩增的特异性。

4）PCR 扩增产物：对于 PCR 产物可以采用酶切或 Northen 和 Dot 的杂交鉴定，并结合扩增片段的大小来确定是否为目的 cDNA。

14.2.4 cDNA 的克隆及测序

随着各种载体的出现，cDNA 的克隆测序已成为轻而易举的事情。如 Promega 公司的 T-vector 和 T-Easy Vector 便是极易进行克隆测序的载体。通常进行目的 cDNA 克隆及测序的方法流程是：

1）cDNA 片段与载体进行联接反应（多在 4℃下进行低温联接）；

2）使用两次 $CaCl_2$ 沉淀法制成的感受态细菌（如 DH5a 或 Jm109 等菌株），进行转化；

3）结合载体抗生素抗性特点，进行菌落的蓝白斑筛选；

4）单个菌落的扩增培养及质粒的提取，酶切鉴定；

5）阳性质粒的纯化及序列测定；

6）cDNA 序列的测定：现在多使用核酸自动测序仪来进行序列的测定。使用仪器多为 PE 公司的 337 型自动测序仪。这种仪器一个反应可以读出约 700bp 长的核酸序列，正确率在 90%以上，一个反应的成本约在 100 元（人民币）左右。由专业人员进行的测序一般可以保证正确率达到 95%以上，但要完全正确的读出序列，则需通读双链，并进行技术性分析及纠错才可得到。一般认为，在技术完善的情况下，影响测序的因素主要是 cDNA 本身的结构，如 G 和 C 含量过高，序列的一端有 polyT 结构等。

14.2.5 cDNA 序列的分析及蛋白质一级结构的确定

测序后，序列结果回报，对其进行分析是异常重要的项目。现在可以在计算机上利用相关的分子生物学工具软件，或在 Internet 网上的相关站点进行分析。其中非常重要的一项分析便是蛋白质一级结构的确定。

1）首先是对所得 cDNA 进行同源性的比较。通常是在 NCBI

的 GenBank 数据库中来完成，利用 Blast 程序，比较其与已知基因的同源性。

2）判断是否为完整的 cDNA 序列：如有无 polyA，有无起始和终止密码子。寻找开放性阅读框架（ORF，open reading frame）等。

3）在上述分析完成后，我们便可以根据已确定的阅读框架将核苷酸序列翻译成氨基酸序列。现在各种工具软件很多，常用的如 DNAsis 及 GoldKey 等。在 GenBank 及 Swissprot 的网站上也可进行类似的工作，它们可以按照 3′和 5′两个方向提供六种阅读框架的翻译结果。你可从其中根据所确定的框架非常方便的任选其一。

本章以血浆激肽释放酶新底物 PK-120 为例，详细描述根据 PK-120 的水解肽段，设计引物，通过 RT-PCR 法筛选 PK-120 基因，用 cDNA 法推测和决定 PK-120 蛋白质一级结构。

PK-120 是一种分子量为 120 kDa 新发现的血浆蛋白，用层析方法能得到高纯度样品。PK-120 具有被血浆激肽释放酶（plasma kallikrein，PK）特异水解的特性，因而称为 PK-120。

将纯化的 PK-120 和 PK 以不同比例（100∶1，50∶1，40∶1）温孵，并进行 SDS-PAGE 电泳，可以观察到随 PK 量增加，PK-120 被 PK 先切成 100 kDa 和 35 kDa。100kDa 进一步被切成 70kDa。70 kDa 与 100 kDa 片段和 PK-120 一样，和抗 PK-120 单克隆抗体 A_2 反应，也说明 100 kDa 是 70 kDa 的前体。

从 PK-120 组成分析[6]得知：可能含有 3 个半胱氨酸；芳香氨基酸含量低，因此克分子消光系数较低，糖的含量为 22%，其中中性糖为 8%、氨基糖 7%、唾液酸 7.6%。图 14.1 列出了 PK-120 和 70 及 35 kDa 的 N 末端序列，这提示 70 kDa 和 35 kDa 分别来源于 PK-120 的 N 端部分和 C 端部分。因此，PK-120 由 PK 引起限定分解的模式如图 14.2 所示。用蛋白质序列数据库对 PK-120 和它的 35 kDa 片段 N 末端序列进行同源性检索，表明它是一个新的血浆蛋白。

PK-120：Glu-Lys-Asn-Gly-Ile-Asp-Ile-Tyr-Ser-Leu-

100kDa：Glu-Lys-Asn-Gly-Ile-Asp-Ile-Tyr-Ser-Leu-

70kDa：Glu-Lys-Asn-Gly-Ile-Asp-Ile-Tyr-Ser-Leu-

35kDa：Arg-Leu-Ala-Ile-Leu-Pro-Ala-X-Ala-Pro-

图 14.1　PK-120 及 PK 切断 PK-120 后产生的片段的 N-末端

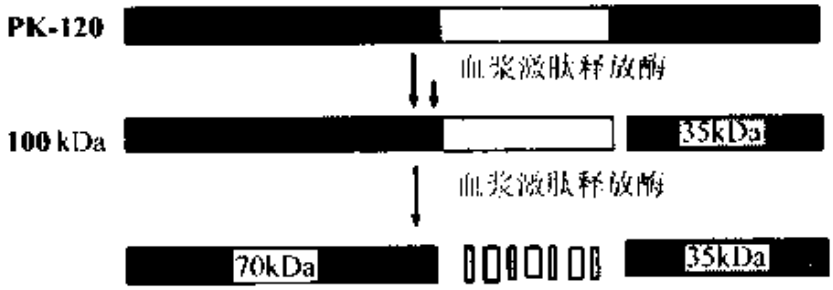


图 14.2　PK-120 被血浆激肽释放酶限定水解的模

14.3　PK-120 的纯化及肽段氨基酸序列分析

14.3.1　仪器及材料

14.3.1.1　仪　　器

1）Applied Biosystems model 477A 气相蛋白质测定仪/Applied Biosystems 120A PTH 分析仪

2）反相高压液相系统

3）μBondasphere S-5 C8 300A 柱（2.1mm×150mm）

4）TSK-GEL ODS-120T 柱（4.6mm×150mm）

14.3.1.2　材料及试剂

1）Q-Sepharose 树脂

2）S-Sepharose 树脂

3）hydroxyapatite 羟基磷灰石

4）Sephacryl S-200 凝胶

5）赖氨酸内切酶

6）乙腈及三氯醋酸

14.3.2 PK-120 的纯化

14.3.2.1 聚乙二醇组分制备

枸橼酸磷酸右旋糖苷抗凝人血浆 500ml，使其含有 1mmol/L PMSF（蛋白酶抑制剂），0.1mg/ml polybrene，100mmol/L 赖氨酸，80mmol/L $BaCl_2$，然后加入 25g 聚乙二醇 4000（PEG），搅拌 30min，6000r/min 离心 10min，离心沉淀溶于 200 ml 含 1mmol/L PMSF，0.01mg/ml SBTI（大豆来源的胰蛋白酶抑制剂），2μg/ml FUT-175，10mmol/L 赖氨酸，20mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.4），以 15%PEG 再沉淀，6000r/min 离心 10min，以相同缓冲液 300ml 溶解沉淀，置 4℃ 备用。以下柱层析操作中的缓冲液都含有上述蛋白酶抑制剂。

14.3.2.2 Q-Sepharose 柱层析

柱体积为 φ4cm × 27cm，预先用含 10mmol/L 赖氨酸 20mmol/L Tri-HCl 缓冲液（pH7.4）平衡，将 14.1.2.1 制备的血浆 PEG 组分上样，流速为 190ml/h。先用 500ml 平衡缓冲液洗脱，洗去未吸附的杂蛋白，然后用含 0.05～0.2mol/L NaCl 的缓冲液（总体积 1000ml）、线性洗脱，收集的各组分和 PK（血浆激肽释放酶，据文献[1]方法纯化）在 37℃ 下，温孵 30min，进行 SDS-PAGE 电泳及考马氏亮蓝染色，被 PK 水解的 120kDa 蛋白为 PK-120，制备抗体后，用双向免疫扩散法或免疫印迹法进行检测，从而鉴定含有 PK-120 的蛋白组分。

14.3.2.3 S-Sepharose 柱层析

将 14.3.2.2 得到的 PK-120 组分中加入 PEG，终浓度达 20%，用 1mol/L HCl 调 pH 至 7.0，离心回收沉淀，用含

10mmol/L EACA（氨基己酸），50mmol/L 醋酸钠缓冲液（pH 6.0）溶解沉淀，预先用相同缓冲液平衡 S-Sepharose 柱（φ2.5cm × 13.5cm），上样，充分洗脱，除去杂蛋白，用含 0.025～0.3mol/L NaCl 的缓冲液线性洗脱，流速 170ml/h，PK-120 的鉴定方法同上。

14.3.2.4 HTP（羟基磷灰石）柱层析

用 10mmol/L 磷酸缓冲液（pH7.4）平衡 HTP 柱（φ1.8cm × 10cm），14.1.2.3 得到的 PK-120 组分上样，用 20mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）洗脱，流速 120ml/h。

14.3.2.5 Sepharyl S-200 凝胶过滤柱层析

14.3.2.4 中得到 PK-120 组分，用 Centriflo membrane (25kDa cutoff; Amicon) 浓缩，以含 0.1mol/L NaCl，0.1% NaN_3，50mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.4）平衡 Sepharyl S-200 柱（φ2.4cm×63cm），上样，洗脱，流速 20ml/h，由此得到的 PK-120 作为纯化样品，供以下实验用。

14.3.3 分离纯化肽段及测定氨基酸序列

纯化的 PK-120 和 PK 温孵，37℃ 30min（酶与底物的比例为 1:50）。用 0.1mol/L NaCl，Tris-HCl pH7.4 平衡 Sepharcyl S-200 柱（φ2.4cm × 63cm），上样，由 PK 水解 PK-120 产生的 70kDa 和 35kDa 片段，出现在不同的洗脱峰，由 SDS-PAGE 鉴定 70kDa 和 35kDa 片段。如前所述，70kDa 和 35kDa 分别来自 PK-120 的 N 末端和 35 kDa 片段经赖氨酸内切酶水解测定的多肽序列 C 末端。由 C 末端来源的 35KDa 经吡啶乙基化 (S-pyridyethylation)还原反应，再用赖氨酸内切酶水解，37℃，16h（酶与底物的比例 1:50）。上样反相高压液相 pBondasphere S-5C8 300A 柱，流动相为水-乙腈-0.1%TFA，收集各组分，进一步上样反相高压液相 TSK-GEL ODS-120T 柱进行层析分离，

收集洗脱各肽段，用 Applied Biosystems model 477A 气相蛋白质自动测序仪/Applied Biosystems 120 A PTH 分析仪以 Edman 降解法对分离肽段 N 末端进行氨基酸序列分析，结果如图 14.3 所示。

35 kDa fragment

N-terminal	:	D-L-A-I-L-P-A-X-A-P-P-A-X-X-N-P-D-A-V
internal		
K-1	:	P-A-V-X-R-V-M-N-M-K
K-3	:	N-P-L-V-W-V-H-A-S-P-E-H-V-V-V
K-6	:	E-T-L-F-S-V-M-P-G-L23
K-7	:	I-E-E-T-T-M-T-T-Q-T-P-A-P-I-X
K-13 (8, 9)	:	A-G-F-S-X-I-E-V-T-F-K-N-P-L-V
K-14	:	A-T-Y-A-T-I-D-F-T-L
K-15, 16	:	T-G-L-L-L-L-S-D-P-D-K-V-T-I-G-L-L-F-W-D-G-R-G-E-G-L

图 14.3　35kDa 部分多肽序列

14.4　部分分解多肽两端有关的 PCR 法筛选 *PK-120* 基因

部分分解多肽氨基酸序列 20 个左右残基长度，用编码多肽两端的 PCR 引物进行 PCR 反应，能够检测 PCR 产物的长度，用此法得到的 cDNA 只有几十个碱基对，但它将成为后续筛选基因的重要突破口。

14.4.1　仪器及材料

14.4.1.1　仪器

PCR 扩增仪

14.4.1.2　材料及试剂

1) Sephadex-50

2) Gene Amp RNA PCR 试剂盒

3）合成寡聚核苷酸用 BIO-SYNTHESIS, INC 公司产品合成寡聚核苷酸

4）抽提液

5）750mmol/L 醋酸铵-10mmol/L 醋酸镁-0.1mmol/LEDTA-0.1% SDS-1% TE 饱和酚

6）25μg/ml 酵母 tRNA

7）其他试剂均为市售

14.4.2 引物设计

如图 14.2 所示的 PK-120 部分分解多肽氨基酸序列中，最长序列 K-15，16 为引物设计的依据：①考虑全部编码的组合，②考虑人编码的使用频率，设计 PCR 引物，正义链及反义链如（图 14.4）所示，用这些引物获得的 PCR 产物当中，50bp 的产物为目的 cDNA。

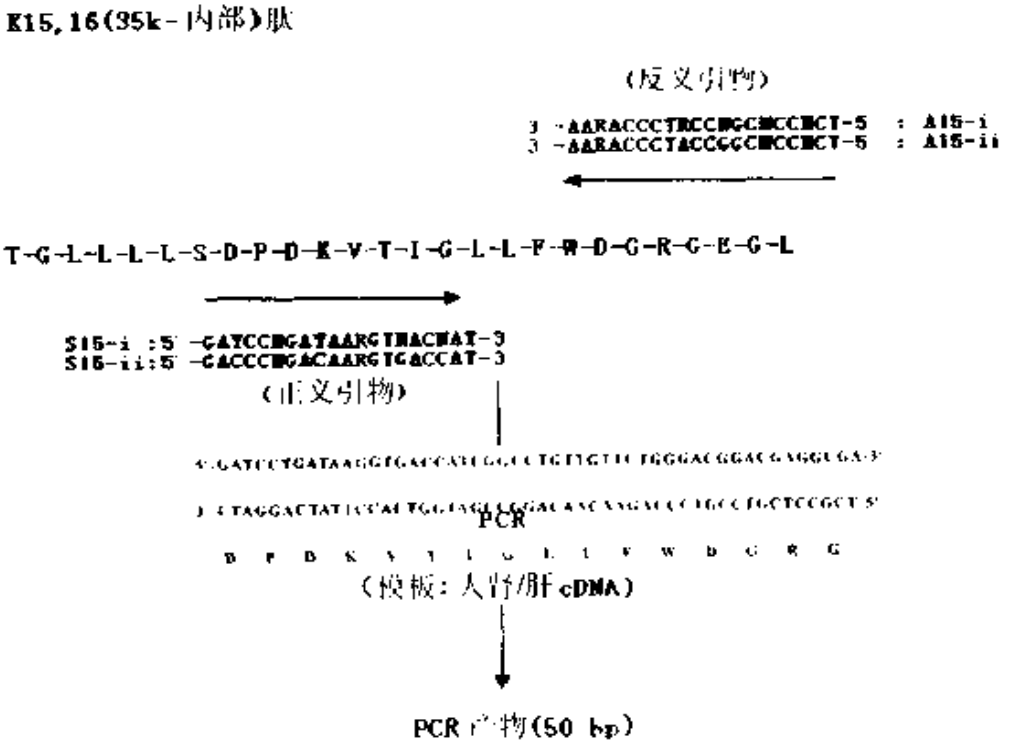


图 14.4 用 RT-PCR 法制备 50bp DNA 探针

14.4.3 PCR 扩增

从肝脏来源的 poly (A)$^+$ RNA 中，用 Gene Amp RNA PCR kit 试剂盒，如以下所述，合成 cDNA。0.1μg 的 poly (A)$^+$ RNA 中，加入 5mmol/L $MgCl_2$、1×PCR 缓冲液 II，2mmol/LdNTPs，1μ 的 RNase inhibitor，2.5μmol/L random hexamers 及 2.5μ 反转录酶，混匀，总体积为 20μl。在 PCR 扩增仪上反应，PCR 参数为 25℃ 10min，42℃ 30min，99℃ 5min，25℃ 5min，第 1 循环反应，合成 cDNA。在反应液中再分别加终浓度为 2mmol/L $MgCl_2$，1×PCR 缓冲液 II，加 1nmol 3′引物及 5′引物，混合，总体积为 100μl。94℃，3min 1 循环，94℃，1min，37℃ ~ 42℃，2min，72℃，2min，40 循环，72℃，7min 1 循环。

14.4.4 凝胶电泳及提取 DNA

纯化 PCR 产物后，在 0.25×TBE 溶液中，进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳，分子量标准使用限制性酶 *Msp*I 消化的质粒 pBR322。电泳结束后，凝胶经溴化乙锭染色，紫外照射，观察到 50bp 的 PCR 产物，将这 50bp 的条带切下，在抽提液中，室温放置过夜，之后 1200r/min 4℃ 离心 10min，回收上清，反复操作两次，用乙醇沉淀 2 次，用 TE 液溶解，上样 Sephadex-50 柱，再用乙醇沉淀洗脱组分，沉淀悬浮于 TE 溶液。

14.4.5 测定碱基序列

抽提出的 PCR 产物用 pCR II 载体亚克隆，测定碱基序列。其结果以肝脏 poly mRNA 为模板，据引物 S15-i 和 A15-i 扩增的 50bp 的 PCR 产物序列，和从氨基酸序列预测的碱基序列完全一致（图 14.4）。表明这是编码目的部分分解多肽的 cDNA。

14.5 PK-120 cDNA 克隆[3]

14.5.1 仪器及材料

14.5.1.1 仪器

PCR 扩增仪

14.5.1.2 试剂

1) Ready-To-Go DNA 标记试剂盒
2) 人肝脏 λgt11cDNA 文库
3) 人肝脏 λgt10cDNA 文库
4) 杂交溶液：7% （w/v）聚乙二醇 6000，10% SDS，100μg/ml 酵母 tRNA
5) SSC 溶液：15mmol/L 枸橼酸钠，15mmol/L NaCl，pH 7.0
6) pBluescript II SK 载体

14.5.2 杂交反应

抽提出的 50bp 的 PCR 产物用 PCR II 载体亚克隆，大量制备，用限制性消化酶 EcoRI 将 50bp 的插入片断切下，用[α-^{32}P] dCTP 标记已克隆的 50bp DNA，并作为探针筛选人肝脏 λgt11cDNA 文库，获得 11 个阳性克隆，测定最长的阳性克隆 λPK5 序列，这个克隆（1.7kb）编码 PK-120 的碳末端（图 14.5），为了获得编码 PK-120 其余部分的克隆，用 [^{32}P dCTP] 标记的 λPK5 插入片段作为探针筛选人肝脏 λgt10cDNA 文库，在杂交液中 60℃ 预杂交，65℃ 杂交过夜，然后在 60℃ 用含 0.1%SDS 的 2×SSC 溶液 30min 洗 4 次，洗净。将阳性克隆的插入片断进一步亚克隆，插入 Bluescript II SK-vector 载体，获得 106 个阳性克隆，测定阳性克隆 λPK67（3.0kb）序列，λPK67 编码 PK-120 的非 5′端密码子区域及 PK-120 氮末端，并

含有信号肽序列（图 14.5）。

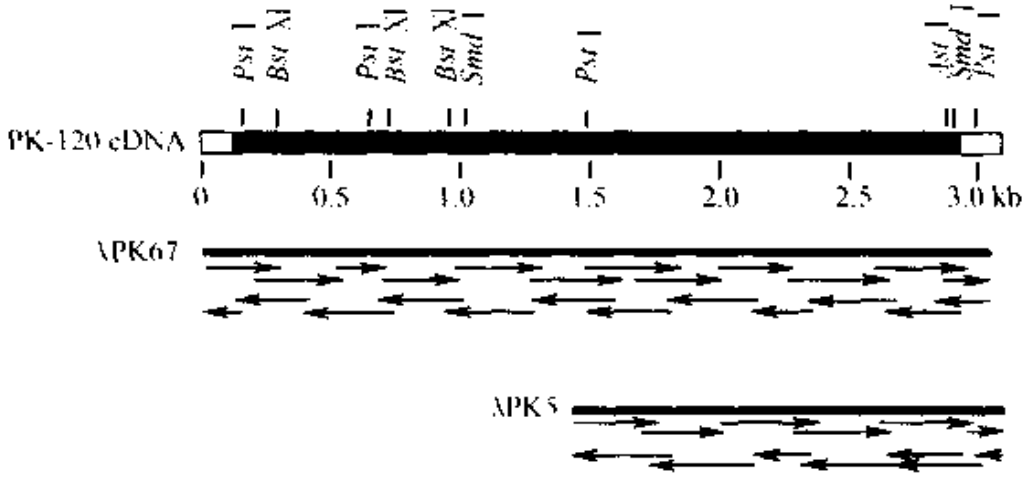


图 14.5　限制性酶切图谱和测序策略。上方黑框表示开放阅读框，下方每一个箭头表示测序方向

14.5.3　cDNA 推测 PK-120 一级结构的特征

PK120 的核甘酸序列及据此推导的氨基酸序列见图 14.6[15]。*PK-120* 的 cDNA，编码区为开放阅读框，有 2790bp，以密码 ATG 为起始，以密码 TAG 为结尾，从而推测出 PK-120 蛋白质氨基酸序列。它含有 28 个氨基酸组成的信号肽，成熟蛋白有 902 个氨基酸组成，20%序列为蛋白质测序所证明。有四个 N-糖基化部位，有三个半胱氨酸残基，这和 PK-120 的氨基酸组成测定结果一致。Cys^{749}和 Cys^{892}在 35kDa 片段内形成二硫键，Cys^{386}以游离状态存在。PK 的酶切位点附近的序列是-Phe-Arg-Xaa-。Arg^{455}，Arg^{633}和 Arg^{660}是 PK 的切断部位。

据同源性分析表明；PK-120 氨基酸序列和人胰蛋白酶抑制剂（inter-α-trypsin inhibitor，ITI）超家族的重链 HCs 有关，和 HC1，HC2 分别具有 34%，31%的同源性，和人前 α 胰蛋白酶抑制剂 HC3 有 38%的同源性。已有的研究表明[2]，PK-120 和 ITI 一样，是一种主要急性相蛋白，这为研究炎症产生的复杂过程打开了新的大门。

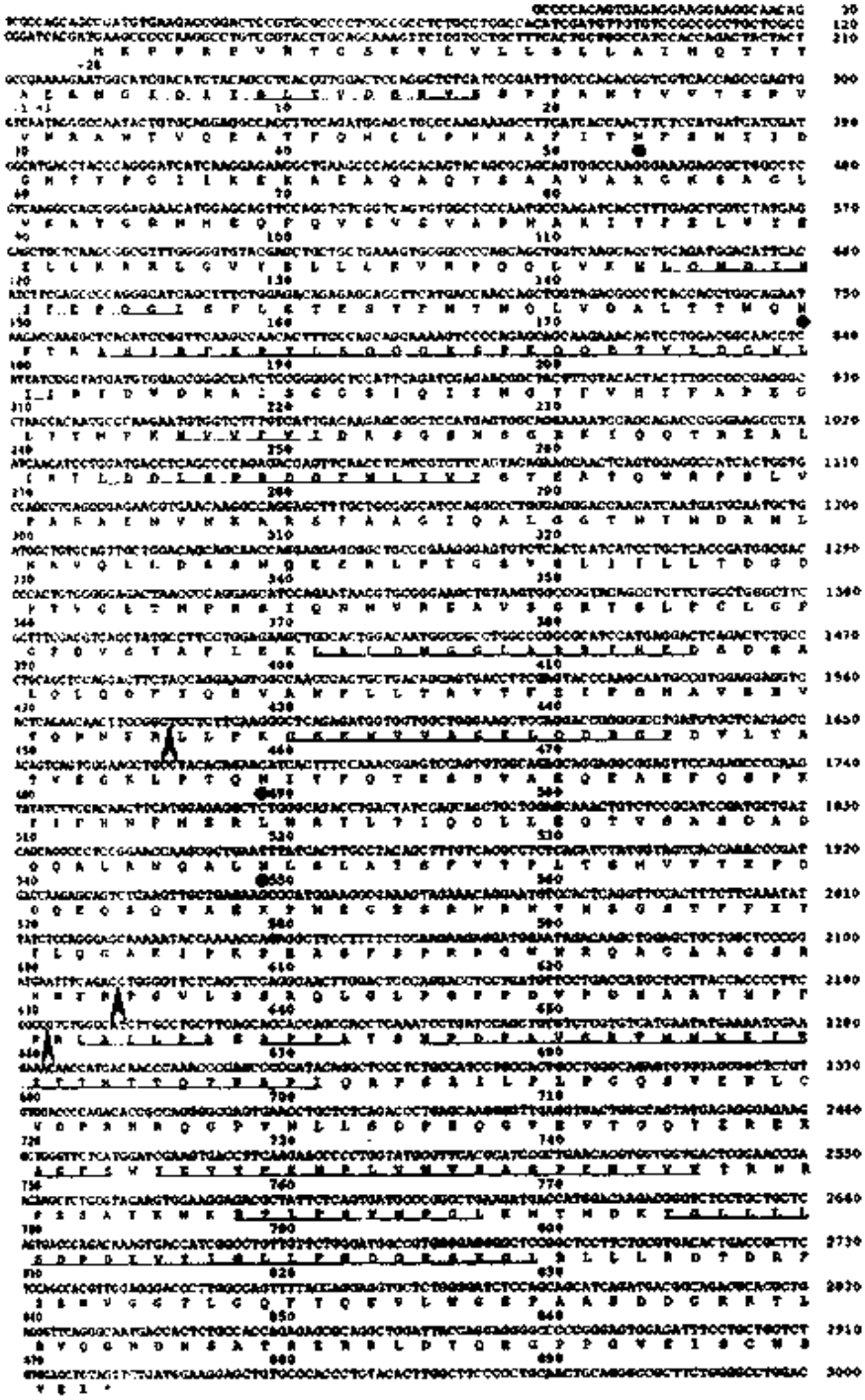


图 14.6　*PK-120* 的核苷酸序列(上)和推导的氨基酸序列。polyA 信号用(AATAA)用黑粗线标出,规定蛋白质序列的氨基酸残基用细黑线标出,PK 待定的裂解部位(-Phe-Arg-Xaa-)用黑箭头标出,N-糖基化位点(-Asn-Xaa-Ser/Thr)用黑点标出

参 考 文 献

[1] Benson, D., D. J. Lipman and J. Ostell 1993. GenBank. Nucleic Acids Res., 21: 2963 - 2965.

[2] Gonzale-Ramon, N. et al. 1995. The Major acute phase serum protein in pig is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120. FEBS Letters, 371: 227 - 230.

[3] Hitoshi Nishimura and Ikukokakizaki. 1995. cDNA and deduced amino acid sequence of human PK-120, a plasma kallikrein-sensitive glycoprotein. FEBS letters, 357: 207 - 211.

[4] Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of peptides electroblotted onto PVDF membranes. J. biol. Chem., 262: 1 - 35.

[5] Nagase, H. and A. J Barrett, 1988. Human plasma kallikrein-A rapid purification methods with high yield. J. Biochem., 193: 187 - 192.

[6] Pu. X. P. and Nagasawa S. Biochimica. 1995. Purification and charaterization of a novel substrate for plasma kallikrein (PK-120) in human plasma. Biophysica Acta, 1208: 338 - 343.

[7] Yuan, S. W et al. 1989. Microanalysis of SDS-PAGE electroblotted proteins. Biological Techniques, 7: 74.

蒲小平　刘耀波　汪家政

附录 1

常用化学物质分子量

化学物质	分子量/Da	摩尔浓度/mol/L
3-磷酸-4-氯-5-溴吲哚（BCIP）	348.7	
4-氯-1-萘酚	178.6	
ACES	182.2	
ATP 二钠盐	605.2	
CAPS	221.3	
CHAPS	614.9	
CHES	207.3	
DOC	392.6	
DMF	73.1	
DTT	154.3	
EDTA	292.2	
EGTA	380.35	
HEPES	238.3	
IPTG	238.3	
LDS	272.3	
MES	195.2	
MOPS	209.3	
NBT	817.6	
PMSF	174.2	
N, N'-甲叉双丙烯酰胺	154.2	
N 三羟乙基甘氨酸	163.2	
PIPES	302.4	
SDS	288.4	
TCA	163.4	

续表

化学物质	分子量/Da	摩尔浓度/mol/L
TEMED	116.2	
TES	229.25	
Tricine	179.2	
Tris	121.1	
β-丙氨酸	89.1	
氨基黑 10B	616.5	
巴比妥	128.1	
冰醋酸	60.05	17.4
丙三醇	92.1	
丙酮	58.1	
丙烯酰胺	71.1	
醋酸钠	82.0	
叠氮化钠	65.0	
二巯基乙醇	78.1	14.4
三辛可宁酸（BCA）	420.5	
甘氨酸	75.1	
甘氨酸-HCl	111.5	
甘氨酸-NaOH	97.1	
甘氨酰替甘氨酸	132.1	
高氯酸	100.5	11.6（70%）
过硫酸铵	228.2	
核黄素（维生素 B_2）	376.4	
琥珀酸	118.1	
琥珀酸二钠	162.1	
甲醇	32.0	
甲醛	30.0	12.1（37%）
甲酸	46.0	23.4

续表

化学物质	分子量/Da	摩尔浓度/mol/L
甲酸钠	68.0	
酒石酸钠	230.1	
考马斯亮蓝 R-250	826.0	
亮肽素	493.6	
两性去垢剂（Zwittergent 3-14）	363.6	
磷酸	80.0	18.1（85%）
磷酸一氢钠	142.0	
磷酸二氢钠	120.0	
硫酸	98.1	18（96%）
硫酸铵	132.1	
硫酸铜	159.6	
氯仿	119.4	
氯化钾	74.6	
氯化镁	95.2	
氯化钠	58.4	
尿素	60.1	
柠檬酸	192.1	
柠檬酸钠	294.1	
硼酸	61.8	
氢氧化钾	56.1	
氢氧化钠	40.0	
三水合甲次砷酸钠	214.0	
双氧水	34.0	8.8（30%）
碳酸氢钠	84.0	
碳酸钠	106.0	
吐温 20	1228.0	
胃酶抑素 A	686.0	

续表

化学物质	分子量/Da	摩尔浓度/mol/L
戊二醛（组织固定剂）	100.1	
硝酸	63.0	16（70%）
硝酸银	169.9	
溴酚蓝钠	692.0	
盐酸	36.5	12.1（36.5%～38%）
盐酸胍	95.5	
异丙醇	60.1	
乙醇	46.1	
乙二醇	62.1	
氢氧化钠	35.0	14.5（30%）
抑肽酶	6500.0	
蔗糖	342.3	

注：表中的百分比浓度等于100mL溶剂中溶解的溶质克数

附录 2

一些蛋白质的分子量和等电点

蛋白质	分子量/Da	等电点
细胞色素 c	11700	9.6
RNA 酶	13700	
溶菌酶	14300	
* 血红蛋白	15500	
肌球蛋白	17200	
*β-乳球蛋白	18400	
菠萝蛋白酶	22000	9.7
木瓜蛋白酶	23000	8.75
人碳酸酐酶	28000	6.5
碳酸酐酶	29000	
猪红血球碳酸酐酶	30375	7.3
牛碳酸酐酶	31000	
羧肽酶	34600	6.0
胃蛋白酶	35000	
* 甘油醛-3-磷酸脱氢酶	36000	
* 乳酸脱氢酶	36000	
原肌球蛋白	36000	
* 酵母乙醇脱氢酶	37000	
* 醛缩酶	40000	6.1
* 肝乙醇脱氢酶	41000	
* 烯醇酶	41000	
卵清蛋白	43000	4.8
* 延胡索酸酶	49000	
扁豆凝集素（二条带）	49000	

续表

蛋白质	分子量/Da	等电点
扁豆凝集素（三条带）	4900	7.8、8.0、8.2
豚鼠胰α淀粉酶	52000	8.4
亮氨酸氨肽酶	53000	
*谷氨酸脱氢酶	53000	
*过氧化氢酶	60000	5.8
人血红蛋白A	64500	7.1
人血红蛋白C	64500	7.5
血清白蛋白	68000	
鼠肝醇脱氢酶	68000	9.7
大肠杆菌L-天冬酰胺合成酶	80000	5.5
*磷酸化酶a	94000	
人胎盘碱性磷酸化酶	116000	4.6
*β-半乳糖苷酶	130000	
马肌红蛋白（一条带）	175000	6.8；7.0
肌球蛋白重链	220000	
藻青蛋白	232000	4.63
大肠杆菌L-高丝氨酸脱氢酶	360000	6.1

带*的蛋白质在天然状态下以寡聚物形式存在。选自G. D. Fasman ed. 1989. Practical Handbook of Biochemistry & Molecular Biology. Boca Raton Florida: CRC Press, Inc.

附录 3

硫酸铵沉淀剂表

最终浓度

初始浓度	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%
0%	27	55	84	113	144	176	208	242	277	314
5%		27	56	85	115	146	179	212	246	282
10%			28	57	86	117	149	182	216	251
15%				28	58	88	119	151	185	219
20%					29	59	89	121	154	188
25%						29	60	91	123	157
30%							30	61	92	126
35%								30	62	94
40%									31	63
45%										31

最终浓度

初始浓度	55%	60%	65%	70%	75%	80%	85%	90%	95%	100%
0%	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5%	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10%	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15%	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20%	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25%	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30%	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35%	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40%	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45%	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50%	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381

续表

初始浓度	55%	60%	65%	70%	75%	80%	85%	90%	95%	100%
55%		33	66	101	138	175	215	256	298	343
60%			33	67	103	140	179	219	261	305
65%				34	69	105	143	183	224	266
70%					34	70	107	146	186	228
75%						35	72	110	149	190
80%							36	73	112	152
85%								37	75	114
90%									37	76
95%										38

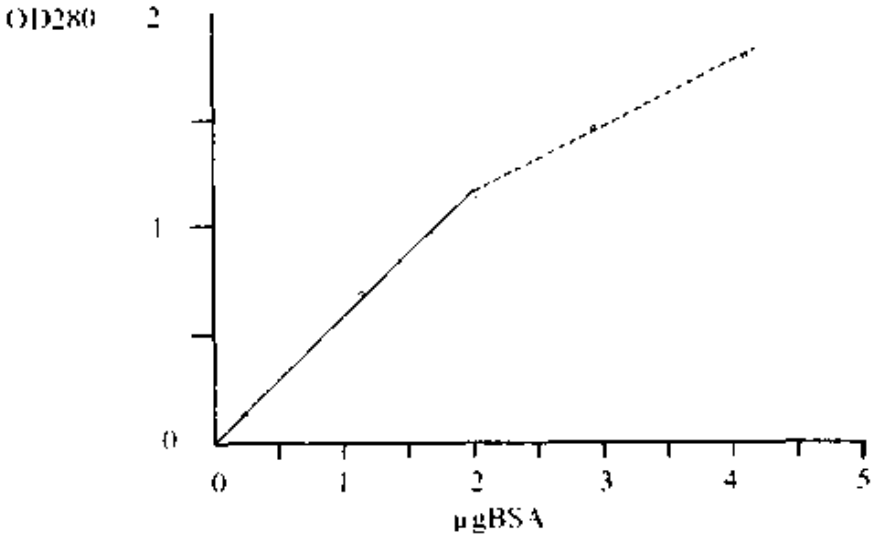
表中数字代表加入 1升溶液中的克数

选自 Scopes, R.K.1982.Protein Purification: Principles and Practice. New York: Springer-Verlag.

附录 4

分光光度曲线

一台分光光度计可精确分辨的吸光率范围通常由照射到光电倍增管上的游离光强度和仪器的光学、电学灵敏度决定。当某仪器游离光强度达到 0.1% 时，用其检测 OD = 3.0（即透射率为 0.1%）的溶液会显示 OD = 2.7（透射率为 0.2%）。溶液的浓度不会大到使 OD 值达到 3.0，但一般仪器的检测范围也远远低于此值，大多数中等分辨率的分光光度计的线性分辨范围都不超过 OD = 1.0－1.8。所以确定一台分光光度计的线性分辨范围是很重要的。实际操作时，准备 0.5% 的 BSA 溶液用以配置一系列不同浓度的稀释溶液，进行测定。绘制 OD280——溶液浓度关系曲线。如附录图 1，在实线虚线交点以下两值呈线性关系，OD 值超出此点时，表观 OD 值均低于线性外推值。



附录图 1　分光光度计线性分辨范围曲线

建议：为慎重起见，在水的吸收为 0 的任何波长下测量时应

避免使样品的(A)值超过1。且狭缝宽度应调至最小，因为宽的狭缝会使仪器线性分辨范围缩小。

李　镭